



DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

FACULTAD DE MEDICINA

UAM

# **EFFECTO NEUROPROTECTOR DEL CONDROITIN SULFATO EN MODELOS DE ISQUEMIA Y NEUROINFLAMACIÓN**

TESIS DOCTORAL

NOELIA CAÑAS FERNÁNDEZ

Directora:

Manuela García López





DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

FACULTAD DE MEDICINA

UAM

**MANUELA GARCÍA LÓPEZ**, Profesora Titular del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA, que Doña NOELIA CAÑAS FERNÁNDEZ ha realizado bajo su dirección el presente trabajo: *Efecto neuroprotector del condroitin sulfato en modelos de isquemia y neuroinflamación*, como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a efectos oportunos, expiden y firman la presente en Madrid a 18 de Noviembre de 2008.

Dra. Manuela García López  
Profesora Titular de Farmacología

JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS.....	6
ABREVIATURAS.....	8
INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. FISIOPATOLOGIA DE LA ISQUEMIA .....	11
1.1.1. <i>Acidosis láctica y disminución de ATP</i> .....	13
1.1.2. <i>Aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular</i> .....	14
1.1.3. <i>Excitotoxicidad.</i> .....	16
1.1.4. <i>Generación de radicales libres.</i> .....	16
<i>Vía PI3K/ Akt y estrés oxidativo</i> .....	17
1.1.5. <i>Neuroinflamación</i> .....	19
<i>Activación in vitro de la astrogli.</i> .....	20
<i>Activación de la vía NFκB.</i> .....	22
<i>Activación de la vía JAK/STAT</i> .....	23
1.2. INTERVENCIÓN DE FÁRMACOS NEUROPROTECTORES EN LA ISQUEMIA	
CEREBRAL.....	24
1.2.1. <i>Glucosaminoglicanos (GAGs)</i> .....	25
<i>La matriz extracelular</i> .....	25
<i>Los glucosaminoglicanos</i> .....	26
1.3. CONDROITIN SULFATO (CS) .....	27
OBJETIVOS .....	30
MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
2.1. CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY 5Y .....	33
2.1.1 <i>Cultivo y mantenimiento.</i> .....	33
2.1.2. <i>Fármacos y tratamientos</i> .....	34
2.1.3. <i>Medida de la Lactato Deshidrogenasa (LDH).</i> .....	34
2.1.4. <i>Valoración de la formación de radicales libres mediante el empleo de la sonda fluorescente DCFDA</i> .....	36
2.1.5. <i>Valoración de la reducción de MTT</i> .....	37
2.1.6. <i>Fragmentación del ADN y estudio del ciclo celular por citometría de flujo</i> .....	38
2.1.7. <i>Determinación de proteínas por western blot.</i> .....	39
2.2. ASTROCITOS PRIMARIOS DE CORTEZA DE RATA.....	40
2.2.1. <i>Cultivo y mantenimiento celular</i> .....	41
2.2.2. <i>Subcultivo para obtención de cultivos de astrocitos puros.</i> .....	42
2.2.3. <i>Protocolo de incubación de fármacos</i> .....	42
2.2.4. <i>Determinación de proteínas por western blot.</i> .....	42



2.2.5. Inmunocitoquímica de p65.....	43
2.2.6. Determinación de citoquinas por RT-PCR .....	43
2.2.7. Obtención de extractos nucleares para determinar p65.....	44
2.3. RODAJAS DE HIPOCAMPO DE RATA.....	45
2.3.1. Obtención de las rodajas de hipocampo de rata .....	46
2.3.2 Privación de oxígeno y glucosa (POG) y tratamientos con los fármacos .....	47
2.3.3. Medida de LDH .....	48
2.4. EXPERIMENTOS IN VIVO .....	48
2.4.1. Isquemia cerebral global en jerbo .....	48
2.4.2. Grupos de tratamiento. ....	49
2.4.3. Inducción de la isquemia cerebral global transitoria.....	49
2.4.4. Estudios histológicos de viabilidad neuronal.....	50
2.4.5. Tinción con Hematoxilina-Eosina. ....	51
2.4.6. Determinación de la lesión. ....	51
2.5. PREDICCIÓN DEL PASO DE LA BHE. ....	51
RESULTADOS .....	53
3.1. EFECTO NEUROPROTECTOR DEL CS EN CÉLULAS SH-SY5Y FRENTE A ESTIMULOS DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	54
3.2. EFECTO DEL CS EN ASTROCITOS ACTIVADOS POR LPS .....	67
3.3. EFECTO DEL CS EN RODAJAS DE HIPOCAMPO SOMETIDAS A PRIVACIÓN DE OXIGENO Y GLUCOSA.....	74
3.4. EFECTO DEL CS EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL EN EL GERBO .....	80
DISCUSIÓN .....	82
4.1 PROTECCIÓN MEDIADA POR CS EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y FRENTE A RADICALES LIBRES.....	83
4.2 INHIBICIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE NFkB EN ASTROCITOS MEDIADA POR CS .....	85
4.3 PROTECCIÓN MEDIADA POR CS EN RODAJAS DE HIPOCAMPO SOMETIDAS A POG .....	88
4.4 EL CS NO PROTEGE EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL EN JERBO .....	90
CONCLUSIONES.....	91
BIBLIOGRAFÍA .....	93
ANEXO .....	105

## JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

---

El trabajo de investigación que se presenta a continuación se enmarca en una de las principales líneas de investigación del Instituto “Teófilo Hernando” para la I + D de fármacos (ITH): la necesidad de investigar y encontrar fármacos neuroprotectores frente a diferentes tipos de daño en el SNC. Hoy en día las enfermedades del SNC y las secuelas que origina en los pacientes, constituye una carga económica para la sociedad y para la sanidad de enormes dimensiones.

Fisiológicamente, la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas cursan con las mismas patologías que desembocan en procesos redundantes como son la inflamación, la generación de radicales libres, y la apoptosis.

La enfermedad cerebrovascular es uno de los motivos más frecuentes de asistencia médica urgente, y constituye la tercera causa de mortalidad en el mundo desarrollado (12-15%) y la primera causa de discapacidad de origen neurológico en la población adulta, aproximadamente 30-40% de los que sobreviven, mantienen una incapacidad importante. Ello hace que la enfermedad tenga un gran impacto económico y social (Flynn et al., 2008). De todos los casos, el 80-85% tiene un origen isquémico. El alto coste social y económico de la enfermedad cerebrovascular y sus secuelas impulsa la investigación dirigida a esclarecer los mecanismos fisiopatológicos responsables de la lesión del tejido cerebral sometido a isquemia, y a encontrar estrategias terapéuticas para paliar las consecuencias clínicas de la isquemia cerebral.

En esta tesis se han utilizado modelos de generación de radicales libres, y neuroinflamación *in vitro*, en rodajas de hipocampo, y modelos *in vivo* de isquemia cerebral global, para probar el posible efecto neuroprotector del Condroitin Sulfato, un fármaco ampliamente utilizado en clínica para la artritis, dado su poder antiinflamatorio y como secuestrador de radicales libres.



## ABREVIATURAS

---

**ADN:** Acido desoxiribonucleico

**Akt/PKB:** Proteína quinasa B

**AMPA:** Acido a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico

**ARN:** Acido ribonucleico

**ATP:** Adenosina trifosfato

**BAPTA:** Acido 1,2-bis (o-aminofenoxil)etano -N,N,N',N'-tetracético. Quelante de calcio.

**BHE:** Barrera hematoencefálica

**COX-2:** Ciclooxygenasa-2

**CS:** Condroitin sulfato

**CSPG:** Proteoglicanos de condroitin sulfato

**DCFDA:** 2'-

7'diclorodihidrofluoresceína diacetato

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**Erk:** Quinasa regulada por señales extracelulares (extracellular signal-regulated kinases)

**EtOH:** Etanol

**GAG:** Glucosaminoglicano

**GFAP:** Proteína ácida fibrilar glial

**GSK-3 $\beta$ :** Glucogeno sintasa quinasa 3 beta

**HA:** Acido hialurónico

**HO-1:** Hemooxygenasa-1

**IL:** Interleuquina

**iNOS:** Oxido nítrico sintasa inducible

**JAK:** Janus quinasa

**LDH:** Lactato deshidrogenasa

**LPS:** Lipopolisacárido

**MAPK:** Quinasas activadas por mitógeno

**MTT:** Sal de tetrazolio

**NF $\kappa$ B:** Factor nuclear kappa B

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**PBS:** Buffer fosfato salino

**PCR/RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (RT: a tiempo real)

**PFA:** Paraformaldehido

**PI3K:** Fosfoinositol 3 fosfato quinasa

**PKC:** Proteína quinasa C

**PNN:** Red perineuronal

**POG:** Privación de oxígeno y glucosa

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**SBF:** Suero bovino fetal

**SNC:** Sistema nervioso central

**snPP:** Protoporfirina de estaño

**SOCS-1:** Supresores de La señalización de citoquinas

**SOD:** Superóxido dismutasa

**STAT:** signal transducers and activators of transcription

**TLR:** Toll-like receptor

**UV:** Ultravioleta



La isquemia cerebral o ictus se origina cuando el flujo cerebral disminuye por debajo de ciertos niveles críticos, y causa daño al tejido por un mecanismo doble. Primero, la falta de oxígeno conlleva una serie de procesos denominados “cascada isquémica”, que se desarrollan con profusión en la introducción de este trabajo, y después, el retorno del flujo o reperusión que provoca la generación de radicales libres en las células. Ambos procesos cursan con inflamación, y pueden desembocar en muerte neuronal.

### 1.1. FISIOPATOLOGIA DE LA ISQUEMIA

En condiciones basales, el cerebro, que constituye un 2% del peso corporal total, consume el 20% del oxígeno. A pesar de la intensa actividad metabólica del tejido cerebral, sus células disponen de muy escasos depósitos energéticos en forma de glucógeno, glucosa, creatinina fosfoquinasa y ATP y de una pequeña cantidad de oxígeno que se agota en 10 segundos. Por lo tanto, el metabolismo y la viabilidad del tejido cerebral dependen principalmente del aporte de oxígeno y nutrientes a través de la rica circulación cerebral que con su intrincada red de ramas colaterales suplen la irrigación en caso de necesidad, y de estrictas medidas de autorregulación. Todo ello garantiza un flujo sanguíneo normal de 50 a 60 ml por minuto por 100 gramos de tejido (15% del gasto cardíaco), el cual aporta la energía necesaria para mantener el potencial de membrana de las neuronas y para preservar sus funciones biosintéticas.

Sin embargo, el cerebro es un órgano que está capacitado para tolerar flujos menores de 15 ml/100g/min; esta isquemia parcial se ha denominado "penumbra isquémica" y se caracteriza por una ausencia de actividad eléctrica que se traduce en una inactividad funcional neuronal (Fernandez-Gomez et al., 2008), la cual es potencialmente reversible si se restablece el flujo sanguíneo adecuado en unas pocas horas.

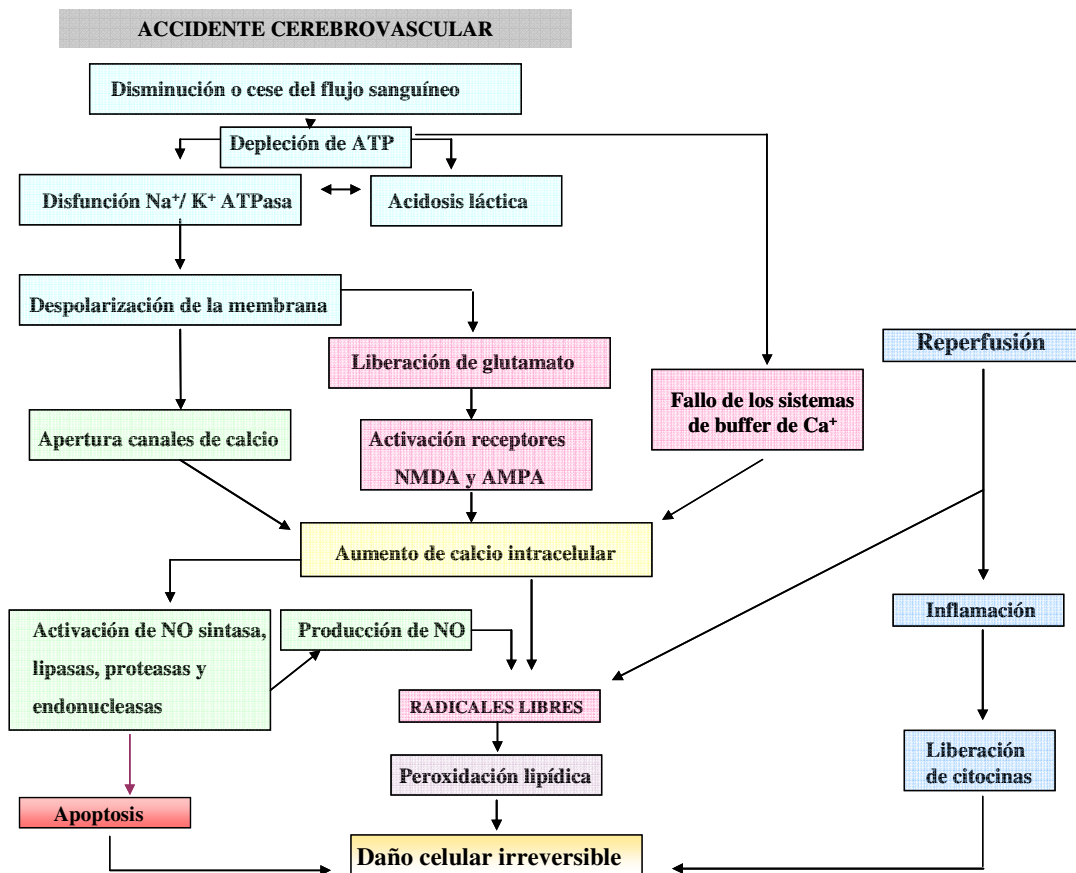
Cuando el flujo se reduce por debajo de 10 ml/100g/min., ocurre la isquemia, con consecuencias desastrosas para el funcionamiento normal de las células nerviosas, su metabolismo y su capacidad de sobrevivir. Gran parte de los procesos metabólicos de las neuronas están dirigidos a conservar y a restablecer los gradientes eléctricos de membrana mediante la diferencia de concentraciones iónicas entre el medio extracelular e intracelular, a través de procesos activos de bombas que

## INTRODUCCIÓN

consumen energía. Al producirse la oclusión vascular tiene lugar una cascada de eventos bioquímicos producidos por una interacción dinámica entre neuronas, astrocitos, fibroblastos, células musculares lisas y endoteliales, que conllevan a la muerte celular (Fig. 1).

Pocos minutos después de iniciado el proceso isquémico, las neuronas se mantienen en un metabolismo anaeróbico, se produce ácido láctico y se reduce el pH intra y extracelular (acidosis) que, unido a la depleción energética, determina la despolarización de las membranas. Además, la hipoxia origina el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, lo que trae consigo la disminución del ATP y otros nucleótidos energéticos. La cantidad de ácido láctico formado dependerá de la cantidad de depósitos tisulares de glucosa y glucógeno.

La persistencia de glucólisis ocasiona una excesiva acidosis que agrava el daño cerebral debido a la producción de radicales libres, liberando el hierro pro-oxidante a partir de proteínas como la transferrina y la ferritina.



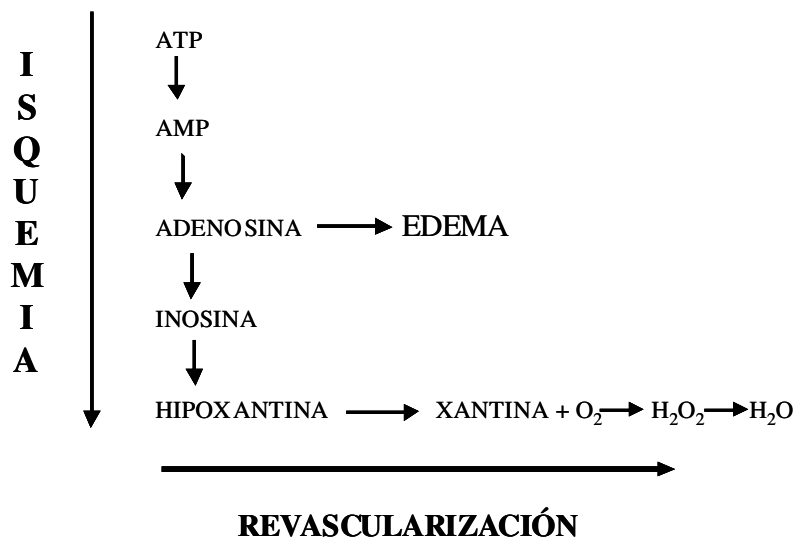
**Figura 1.** Cascada isquémica: procesos celulares implicados en la patología isquémica.



### 1.1.1. Acidosis láctica y disminución de ATP

El oxígeno es el combustible básico de las células, repone en la vía metabólica aeróbica los enlaces de fosfato de alta energía que se necesitan para su normal funcionamiento. Por contra, la vía anaeróbica no llega como la anterior hasta el ciclo de Krebs y tiene un rendimiento energético muchísimo menor. La cadena metabólica se detiene en el ácido pirúvico, que se transforma en láctico sin poder oxidarse por la vía de la Succinil Coenzima A. Por tanto, se produce una acidificación del pH intracelular, lo que, por un mecanismo de autorregulación, conduce a la inactivación de su enzima de conversión, paralizándose el proceso. La acumulación de ácido láctico y el aumento de  $\text{CO}_2$  causan acidosis que permite alcanzar valores de pH de 6. La acidosis en el SNC puede traer consecuencias graves en procesos tan importantes como la neurotransmisión y la homeostasis (Obara et al., 2008).

Durante las 3 primeras horas de isquemia se mantiene precariamente la energía necesaria para los intercambios metabólicos mediante la depleción de las reservas de creatinina-fosfato y la vía anaeróbica. Entre las 3-6 horas se produce el agotamiento de los depósitos de energía, deplecionándose la cadena metabólica completa desde el ATP, que pierde fosfatos, transformándose en ADP y adenosina, que provoca edema celular, y siguiendo la ruta catabólica del ATP hasta el  $\text{H}_2\text{O}$  (Fig. 2).



**Figura 2.** El aumento de adenosina, producto de metabolismo de los nucleótidos de adenina, provoca una intensa vasodilatación e incremento del edema. La isquemia, por otra parte, favorece la transformación de adenosina en hipoxantina que contribuye a la

## INTRODUCCIÓN

---

formación de peróxidos y, a la consecuente alteración de los lípidos de la membrana neuronal

La descripción clásica de la muerte celular comienza por la pérdida de gradiente energético a través de las membranas celulares, el fracaso de la bomba de sodio y calcio, así como el estado de acidosis.

La insuficiencia energética impide que funcionen las ATPasas de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  por lo que se pierde el equilibrio iónico necesario para la viabilidad celular: el  $\text{K}^+$  sale de las neuronas y entra  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y agua. La entrada de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y agua se relaciona con el edema celular. El acumulo extracelular de  $\text{K}^+$  se relaciona con el edema citotóxico de los astrocitos y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pone en marcha mecanismos de muerte celular.

El daño celular inducido por la acidosis engloba el aumento del edema cerebral, la inhibición de la fosforilación oxidativa, el aumento de la concentración intracelular de calcio, la formación de radicales libres y la producción de daño endotelial alterando la microcirculación.

### 1.1.2. Aumento del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

La despolarización de las membranas y la falta de ATP daña la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y aumenta la liberación de glutamato que activa receptores AMPA y NMDA (Graham et al., 1990). La activación del receptor AMPA provoca un acumulo citosólico de  $\text{Na}^+$  y agua y ocasiona edema cerebral y, la estimulación del receptor NMDA junto a la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, origina una entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  con un incremento de su concentración intracelular de aproximadamente el doble de su valor inicial. Este incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico constituye el factor clave en el proceso que conduce al daño cerebral irreversible.

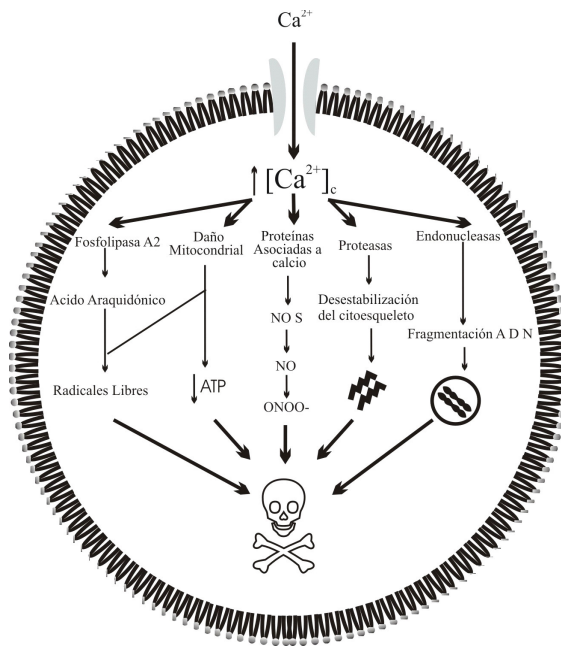
La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  favorece la permeabilidad de la membrana celular, ya que aumenta el consumo de energía tratando de mantener la homeostasis iónica. El  $\text{Ca}^{2+}$  induce también la activación de la calmodulina y ésta a su vez la de una serie de enzimas (proteasas, fosfolipasas, endonucleasas, proteinquinasas, proteinfosfatasas, etc.) que producen destrucción de los componentes estructurales de la célula.

El  $\text{Ca}^{2+}$  provoca también la aparición de radicales libres, ya que estimula la óxido nítrico sintasa (iNOS), provocando un aumento de óxido nítrico que se une al anión superóxido formando radicales libres denominados peroxinitritos. También puede

## INTRODUCCIÓN

interferir en el funcionamiento de determinadas enzimas encargadas de la respiración mitocondrial y alterar la síntesis de ADN.

Por último, el  $\text{Ca}^{2+}$  condiciona la expresión de varios genes de respuesta inmediata que inducen mecanismos apoptóticos mediados por la activación de proteasas cisteína dependientes denominadas caspasas. Estas enzimas (caspasas iniciadoras), se mantienen inactivas como precursores latentes y se activan bajo una señal de muerte celular mediada por diferentes sustancias, estas a su vez activan a otras caspasas que se encargan de ejecutar el proceso (caspasas ejecutoras). Se han descrito al menos 14 tipos de estas enzimas que actúan sobre un gran número de sustratos; entre ellas proteínas del citoesqueleto, proteínas estructurales, proteínas relacionadas con el ciclo celular, proteínas de escisión y reparación del ADN, proteínas de transducción de señales y proteinquinasas, precursores de citoquinas y con otras proteínas dispares (Kohler et al., 2002).



**Figura 3.** Esquema que resume los mecanismos implicados en la muerte celular por la desmesurada elevación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  tras la isquemia.

### 1.1.3. Excitotoxicidad.

El incremento del calcio intracelular da lugar a un incremento de la liberación de neurotransmisores y neuromoduladores; por ejemplo, la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato o el aspartato se multiplican ocho veces durante diez minutos de isquemia, en comparación con la concentración preisquémica. Consecuentemente, se produce una sobrecarga de estímulos de las neuronas que perpetúa la entrada de calcio, la activación de proteasas y, en definitiva, la destrucción celular.

La concentración creciente de aminoácidos excitatorios en los espacios sinápticos causa una acción excitotóxica en las neuronas postsinápticas vulnerables.

La hiperactivación de receptores ionotrópicos de aminoácidos excitatorios (NMDA, AMPA, kainato) en la membrana postsináptica, resulta en un flujo mantenido de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a través de tales canales modulados por ligando. El flujo de  $\text{Na}^+$  causa despolarización que abre los canales de calcio dependientes de voltaje, produciéndose una mayor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como se ha mencionado anteriormente, el calcio neuronal alcanza altas concentraciones y, en consecuencia, activa una serie de sistemas calcio dependientes, como los mediados por calmodulina, proteínquinasa C, fosfolipasa A2 y calpaína. La activación sin control de uno o, quizás, de todos estos procesos se piensa que es la responsable de la muerte neuronal retardada

### 1.1.4. Generación de radicales libres.

Un radical libre es un átomo o molécula con un electrón libre en su órbita, que al unirse a determinadas sustancia tales como los ácidos grasos poli-insaturados de los fosfolípidos de la membrana y ácidos nucleicos (Curtin et al., 2002), son capaces de llevar a cabo una peroxidación no enzimática de los mismos, con la destrucción progresiva de la membrana celular y demás organelas intracelulares (Kohen and Nyska, 2002). También constituyen por si mismos elementos tóxicos, a través de su descomposición en aldehídos debido a la acción del calor o de iones metálicos como el cobre o el hierro (Ischiropoulos and Beckman, 2003).

El desacoplamiento entre los saltos energéticos y la formación de ATP dentro de la cadena respiratoria mitocondrial, así como su bloqueo por el  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en la

## INTRODUCCIÓN

---

mitocondria, facilitan la hiperproducción de radicales libres; se obtienen también de la degradación de las proteínas del citoesqueleto celular y de los lípidos de membrana.

Dependiendo del agente que los cause, se forman los diferentes radicales libres, como los radicales superóxido, radicales libres de  $O_2$ , peróxido de hidrógeno, un radical libre de baja potencia, etc. Normalmente la célula posee sistemas para contrarrestar la sobreproducción de estos radicales, pero si existe un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y los sistemas de secuestro, se pone en marcha la muerte celular por los mecanismos anteriormente citados (Klein and Ackerman, 2003) .

Los radicales libres producen, por tanto, daño neuronal por ataque directo a las estructuras vasculares, o por ataque a los componentes moleculares de la célula, principalmente el núcleo. Provocan, en conclusión, rupturas de DNA, desnaturalización de proteínas, edema celular, lesión del endotelio, aumento de la permeabilidad vascular, peroxidación de los lípidos de membrana y alteraciones de la función mitocondrial. La reperusión ulterior a la isquemia también favorece la formación de radicales libres, puesto que posibilita la presencia de oxígeno (Christophe and Nicolas, 2006). Por lo tanto, los radicales libres tienen un importante papel en el daño por reperusión y neuronal tardío.

### *Vía PI3K/Akt y estrés oxidativo*

Dentro de las principales vías que se activan ante el estrés oxidativo se encuentra la ruta PI3K/Akt (Lee et al., 2006), que se ha implicado en la supervivencia celular frente a estímulos como la excitotoxicidad (Molina-Holgado et al., 2005). La activación de Akt, también conocida como PKB, requiere su migración del citoplasma a la membrana, donde es fosforilada en dos residuos (Thr 308 y Ser 473) (pAkt). Una vez activada, Akt promueve la supervivencia celular por inhibición e inactivación de diversas dianas pro-apoptóticas tales como Bad, procaspasa 9 y GSK-3 (Kwak et al., 2008; Thornton et al., 2008).

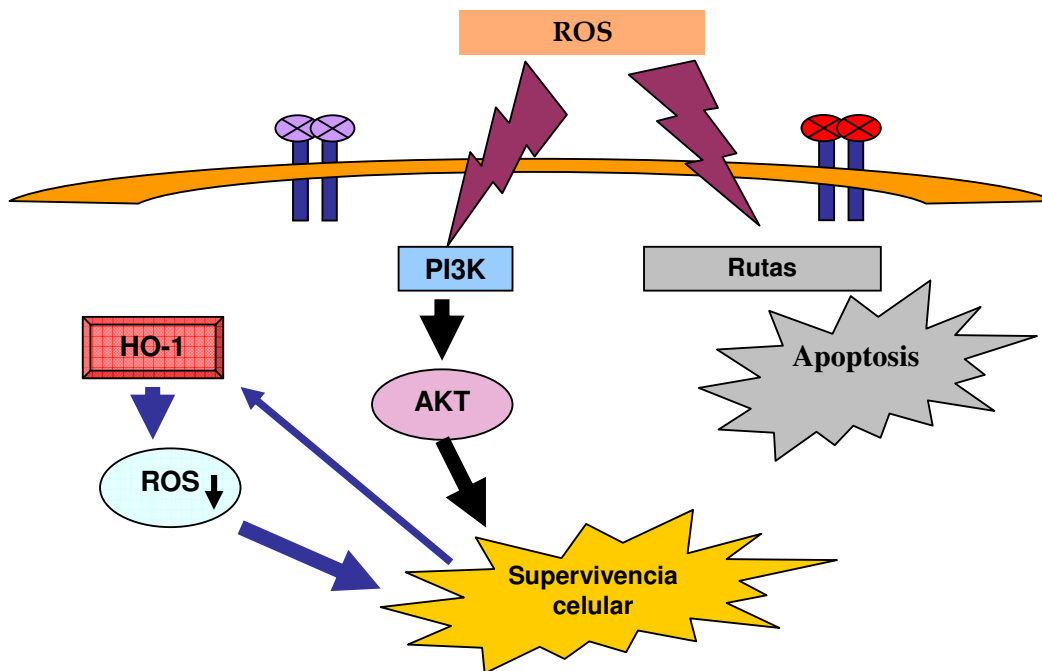
El estrés oxidativo se define como la exposición inadecuada a especies reactivas de oxígeno (ROS) y es la consecuencia del desequilibrio entre el poder antioxidante de la célula y los prooxidantes que puedan generarse. Dependiendo del tipo de ROS que provoque el estrés y de su concentración, la célula puede seguir dos procesos diferentes: la necrosis o la apoptosis.

## INTRODUCCIÓN

La **necrosis** es un proceso pasivo (ATP independiente), en el que se produce la ruptura de la membrana plasmática y un vaciamiento del contenido intracelular al medio extracelular.

Sin embargo, la **apoptosis** o muerte celular programada, es un proceso activo y necesita de ATP para descomponer la célula en pequeños fragmentos (o cuerpos apoptóticos), que están rodeados por membrana plasmática, lo que no afecta a las células vecinas. En modelos de isquemia-reperfusión, este tipo de muerte juega un papel importante (Nakka et al., 2008).

Cuando una célula es sometida a una situación de estrés oxidativo, se activan rutas de señalización que influyen en el equilibrio entre la muerte y la supervivencia. Entre las rutas de señalización activadas se encuentra la de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), y la vía de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K/Akt), que tiene como resultado la inducción de la síntesis de enzimas antioxidantes. Entre ellas se encuentra la hemooxigenasa-1 (HO-1) (Figura 4), encargada de la degradación del grupo hemo a monóxido de carbono, bilirrubina y hierro, que poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras.



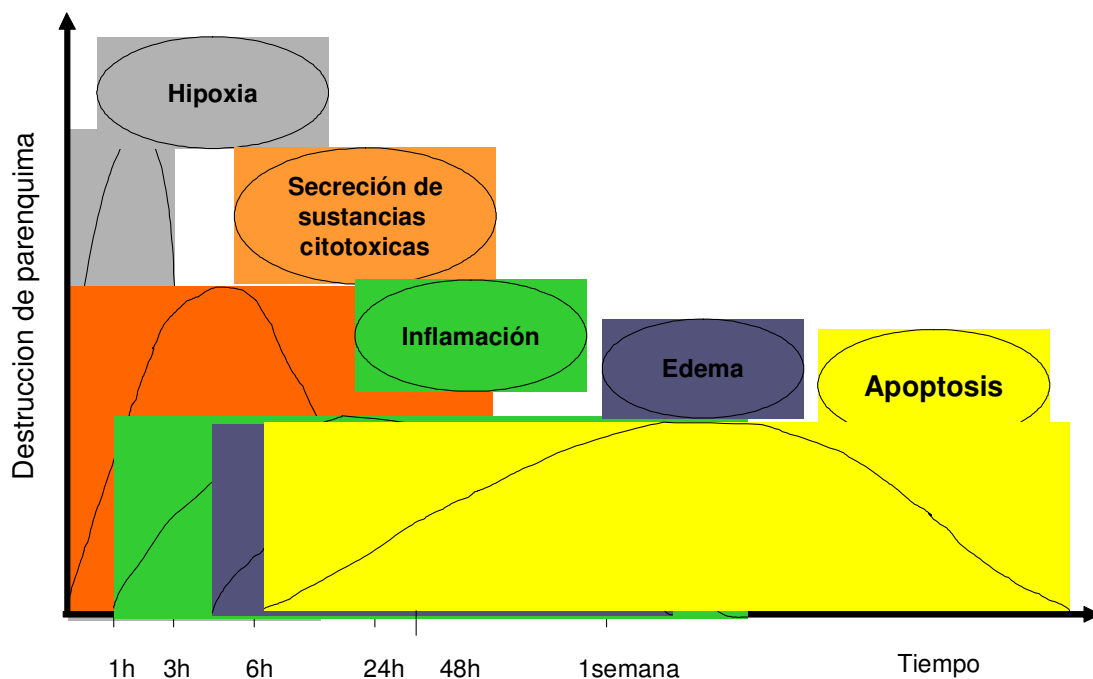
**Figura 4.** Ruta de supervivencia PI3K/Akt inducida por ROS.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1.5. Neuroinflamación

Tras un proceso isquémico, la falta de oxígeno produce una respuesta inflamatoria mediada y modulada por la acción de citoquinas (Fig. 5), seguida de un edema celular y, la subsecuente apoptosis.

El estrés oxidativo (Wong and Crack, 2008), el aumento del calcio intracelular, la liberación de ácidos grasos libres y la liberación de leucotrienos se han implicado en la inducción de la expresión de citoquinas en neuronas y en células gliales. Las principales citoquinas que intervienen en la inflamación inducida por la isquemia cerebral son la interleuquina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF), y la interleuquina-6 (IL-6). La IL-1 y el TNF producen inflamación hística, mientras que moléculas adhesivas como la VCAM-1, aumentan la interacción de los leucocitos con el endotelio vascular, provocan daño a nivel de la barrera hematoencefálica, ocluyen la microcirculación y crean un fenómeno de "no-reflujo" (Persidsky et al., 2006). Las citoquinas inducen la liberación de quimioquinas, que son importantes para la quimiotaxis de los leucocitos hacia la región isquémica. La quimioquina más importante es la interleuquina-8 (IL-8) que interviene en el reclutamiento de los neutrófilos, y cuya liberación está inducida por la IL-1 y el TNF.



**Figura 5.** Evolución de los signos clínicos y patológicos de la isquemia cerebral en el tiempo.

## INTRODUCCIÓN

---

Las principales células de respuesta a inflamación en el SNC son las células gliales. Los astrocitos son las células gliales mayoritarias en el cerebro. En respuesta a un deterioro del SNC ya sea por envejecimiento o por algún daño inducido, los astrocitos poseen la capacidad de responder, experimentando un cambio morfológico y estructural acompañado de la producción de citoquinas proinflamatorias. A este proceso se le denomina “gliosis reactiva” o “glia activada”. Se trata de una respuesta inflamatoria multifactorial dirigida a proporcionar mecanismos de defensa frente a diferentes agresiones; tiene como objetivo eliminar los agentes nocivos causantes y así prevenir sus efectos perjudiciales. En estado activado, los astrocitos pueden liberar neurotrofinas (NGF, BDNF) para promover la supervivencia y la proliferación de los propios astrocitos (Takuma et al., 2004).

Cada vez hay más estudios que sugieren la importancia del papel que juega la inflamación en el cerebro frente a numerosas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la isquemia cerebral. Se considera que en un estado normal, el SNC inhibe tónicamente la activación glial, y que ésta sucede de forma fisiológica ante la presencia de un agente agresor promoviendo la migración de estas células hacia el lugar dañado, pudiendo incluso adoptar un fenotipo fagocítico (Liu and Hong, 2003).

La activación glial puede resultar beneficiosa en el sentido que puede promover la reparación de tejidos, eliminación de restos celulares y la eliminación de patógenos. Sin embargo, una activación excesiva puede ser perjudicial e incluso promover la muerte neuronal (Hanisch, 2002).

### *Activación in vitro de la astroglia.*

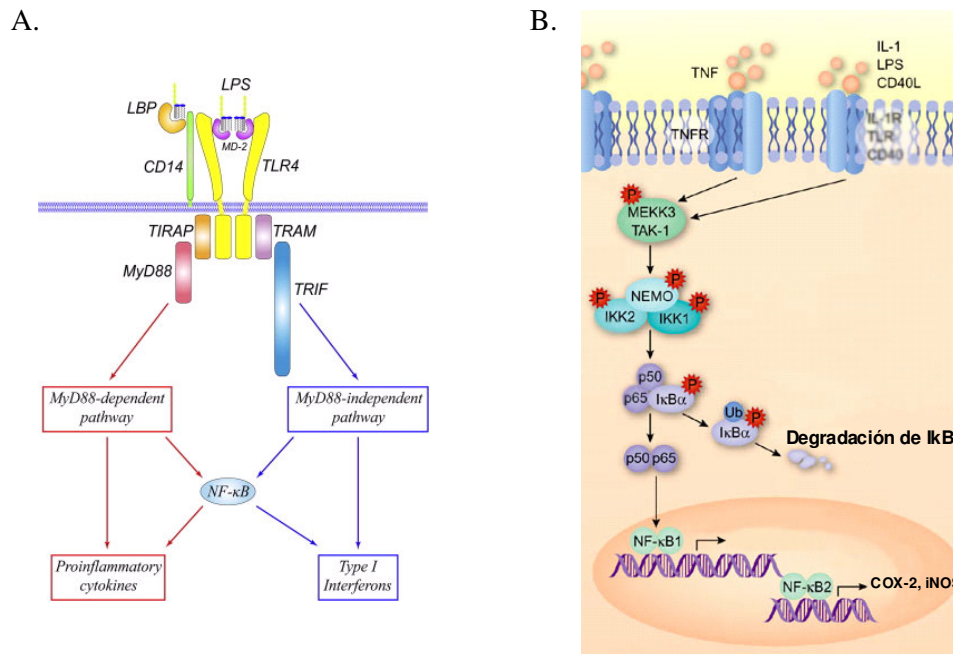
La activación de la glia trae como consecuencia la producción de citoquinas (Zielasek and Hartung, 1996). Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular que incluyen interleuquinas, interferones, factores de necrosis tisular y quimioquinas. Participan en muy diversos procesos celulares como el crecimiento, el desarrollo, la modulación de la inflamación y la respuesta inmune. Se inducen muy rápidamente tras un daño celular, inflamación o infección (Allan and Rothwell, 2001).

El TNF-alfa y la IL-1 son las dos citoquinas pro-inflamatorias mayoritarias en las células gliales durante la inflamación del SNC e inducen la síntesis de moléculas de adhesión y más citoquinas. El TNF-alfa es capaz de activar rutas intracelulares como la de las MAPK y la del factor NFκB (Kaushal and Schlichter, 2008).



## INTRODUCCIÓN

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) es un componente de la membrana celular de las bacterias Gram negativas (Lu et al., 2008). El LPS induce una respuesta inflamatoria muy potente estimulando la producción de citoquinas como TNF- $\alpha$ . Se ha demostrado que una vía pro-inflamatoria esencial activada por LPS es la vía del factor de transcripción NF $\kappa$ B (Zielasek and Hartung, 1996). En el plasma existen proteínas que se unen a LPS, las proteínas fijadoras de LPS (LBP), que se asocian a LPS y promueven la unión de éste a la molécula CD14. Las moléculas de CD14 unidas a LPS activan un receptor de membrana denominado TLR4 (del inglés *Toll Like Receptor*) (Bosschart and Heinzelmann, 2007)(Fig. 6). Así, el LPS induce una respuesta de inmunidad innata mediada por TLR4 que promueve la transducción de señales intracelulares, como es la activación de la vía NF $\kappa$ B (Fig. 6)(Doyle and O'Neill, 2006). También se ha observado que el LPS ocasiona un aumento de los prostanoideos (prostaglandinas y tromboxanos)(Kohno et al., 2008; Mitsopoulos et al., 2008) y de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Wu, 2007). Por ello, la estimulación de astrocitos en cultivo con LPS constituye un buen modelo *in vitro* de activación astrogial.



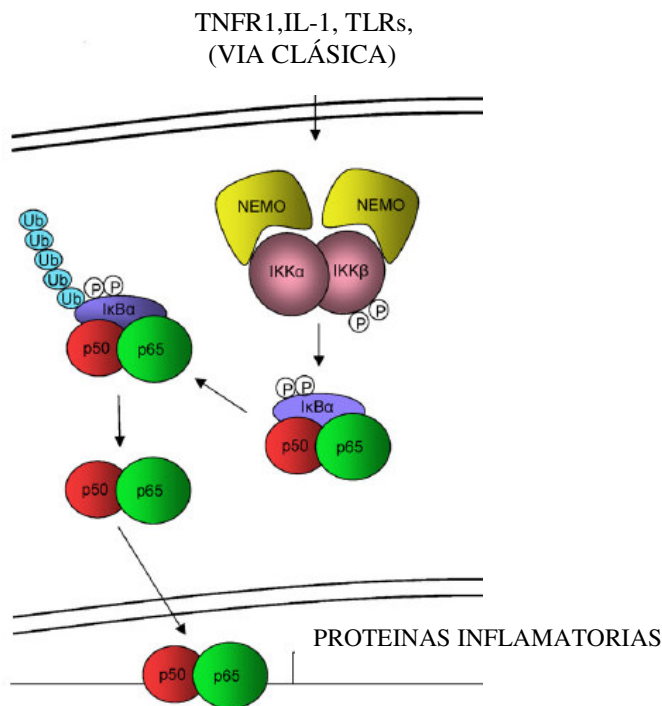
**Figura 6.** Activación de la glia por LPS. A. El receptor TLR4 y sus dianas intracelulares. B. Ruta de activación de NF $\kappa$ B mediada por LPS.

## INTRODUCCIÓN

### *Activación de la vía NFκB*

En un proceso tan complejo como es la activación glial, la transcripción de genes y la activación de factores de transcripción juegan un papel muy importante. El NFκB es uno de los factores de transcripción más importantes relacionados con esta activación y, es uno de los mejor caracterizados en este proceso. (O'Neill and Kaltschmidt, 1997; Ghosh, 1999).

Las proteínas NFκB residen principalmente en el citoplasma, en forma inactivada, unidas al factor de inhibición IκB en las células inactivadas. Tras la activación de la vía por una variedad de ligandos (interleuquinas o LPS), la proteína IκB es fosforilada, ubiquitinizada, y finalmente degradada por el proteasoma (Cheng et al., 1994). Una vez libre de su inhibidor, NFκB (compuesto por las subunidades p50 y p65 en mamíferos (Grimm and Baeuerle, 1994)), se trasloca al núcleo donde transcribe sus genes diana. (Fig. 7)(Kaltschmidt et al., 1999), que están relacionados con la apoptosis (Piotrowska et al., 2008).



**Figura 7.** Vía de activación del factor de transcripción NFκB.

El NFκB se expresa tanto en neuronas como en células gliales y sus genes diana son principalmente proteínas con actividad inmune e inflamatoria: citoquinas

## INTRODUCCIÓN

inflamatorias como IL-6 y TNF-alfa (Sethi et al., 2008), moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 (Quinlan et al., 1999) o enzimas como iNOS y COX-2. (Sethi et al., 2008)

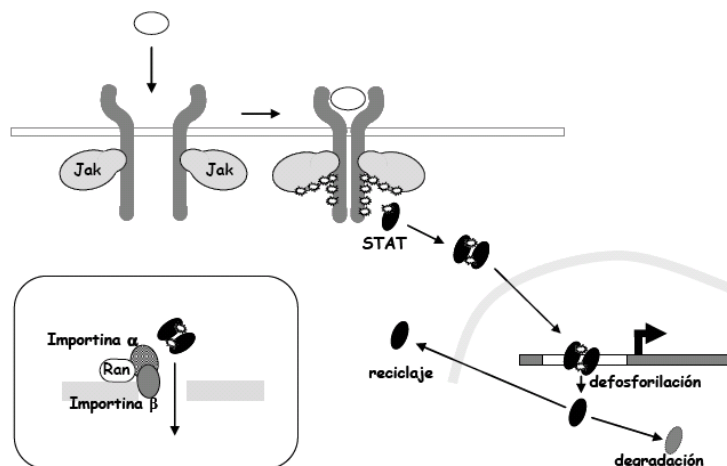
Un dato interesante es que esta vía se encuentra activada en cerebros de pacientes con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o como consecuencia de infecciones víricas (Anisman et al., 2008).

### *Activación de la vía JAK/STAT*

El mecanismo de señalización de los receptores de citoquinas es relativamente sencillo, y depende principalmente de la activación de dos familias de proteínas intracelulares: las JAKS (Janus quinasas) y las STATs (signal transducers and activators of transcription). Por este motivo, a la vía de señalización de estos receptores se le conoce, habitualmente, como la vía de JAK-STAT.

Las JAK son una familia de proteínas con actividad tirosina-cinasa, que en mamíferos está constituida por 4 miembros, con distinta distribución.

Las STAT son una familia de factores de transducción constituida por 7 miembros. La activación de esta vía es iniciada por la unión de un ligando a su receptor. Las JAKS están constitutivamente asociadas al dominio intracelular del receptor, lo que provoca que el cambio conformacional de ésta haga que se aproximen y se transactiven (fosforilación recíproca en residuos de tirosina). Una vez activadas, las JAKS fosforilan tanto al receptor como a las STATs.



**Figura 8.** Mecanismo de activación de la vía JAK/STAT.

En ausencia de estimulación, las STATs se encuentran en el citoplasma y son, por tanto, transcripcionalmente inactivas. Sin embargo, una vez fosforiladas por JAK, las STATs dimerizan a través de sus dominios SH<sub>2</sub> y se traslocan al núcleo. Una vez en el núcleo, los STATs se unen a elementos de respuesta específicos, regulando la transcripción de genes diana (Fig. 8)

Esta vía tiene varios reguladores negativos, entre ellos se encuentra la familia de las SOCS (suppressors of cytokine signalling), que están reguladas positivamente por las STATs, estableciéndose un circuito de retroalimentación negativa.

### 1.2. INTERVENCIÓN DE FÁRMACOS NEUROPROTECTORES EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

La obstrucción de un vaso sanguíneo cerebral ocasiona 2 tipos de lesiones al tejido neuronal: uno inmediato y otro tardío. El primer caso compromete el centro del territorio isquémico denominado **core o núcleo isquémico**; en él se producen daños irreversibles en la estructura celular y muerte neuronal por un mecanismo de necrosis en un corto período. Esta zona va a ser muy difícil de rescatar o incluso irrecuperable.

La lesión tardía corresponde al área que rodea al core, llamada “penumbra” (Lo, 2008), donde el flujo ha descendido a niveles críticos (15-20ml/100g/min.), en esta zona existen alteraciones de la actividad funcional neuronal, pero es *potencialmente recuperable*, ya que conserva una actividad metabólica mínima. La integridad estructural de esta zona depende de la magnitud de la reducción del flujo sanguíneo, de si su distribución es focal o global y de su duración (por lo general hasta 24 horas). Si no se restablece el flujo sanguíneo en esta zona, las células mueren mediante un mecanismo de muerte celular programada o apoptosis. Esta situación ofrece un período útil de varias horas para el rescate de las neuronas de la “**penumbra isquémica**” (Lo, 2008).

Así, se ha demostrado que el volumen de penumbra que escapa del volumen final de infarto se correlaciona altamente con la recuperación neurológica. El área de penumbra es muy inestable y dinámica y, aunque no se produzca posteriormente una reducción mayor en el flujo sanguíneo cerebral, evoluciona hacia un infarto en pocas horas, si la situación de isquemia se mantiene en el tiempo.

Otro factor a tener en cuenta en el tratamiento de un ictus isquémico es la “**ventana de neuroprotección**”, que es el período durante el cual las medidas neuroprotectoras pueden reducir o impedir el daño ocasionado por la isquemia cerebral o por la reperusión tardía en el área de penumbra isquémica. Esta ventana es de mayor duración que la ventana de reperusión, particularmente para los fenómenos de inflamación y apoptosis, que se suceden más tardíamente.

Los fármacos neuroprotectores están dirigidos a intervenir en lo que se ha venido a llamar “*cascada isquémica*”, (procesos descritos anteriormente en la fisiopatología), e intentan revertir o prevenir los procesos que conllevan al daño tisular (Segura et al., 2008). Son muchos los fármacos con propiedades neuroprotectoras que se han evaluado en el ictus. Entre ellos hay un antagonista de los receptores NMDA, el traxoprodil, que actualmente se está desarrollado para la clínica. También se han empleado quelantes de iones de metal como secuestradores de radicales libres e inhibidores de moléculas proinflamatorias como anticuerpos anti- IL 1 $\beta$  y anti-TNF-alfa (Green and Shuaib, 2006). El caso más reciente es el del NXY-059, un secuestrador de radicales libres que presentó resultados muy alentadores administrado en pacientes 6 horas después de haber sufrido un accidente cerebrovascular (Lees et al., 2006). Sin embargo, en un ensayo clínico multicéntrico posterior, realizado en 3195 pacientes, se concluyó que era inefectivo en pacientes con ictus isquémico.(Shuaib et al., 2007)

El fracaso clínico de los numerosos compuestos que sí han demostrado eficacia en modelos *in vitro* e *in vivo* de ictus isquémico hacen pensar que haya que buscar nuevas estrategias. En este sentido, en el ITH buscamos fármacos que actúen a varios niveles de la cascada isquémica con el ánimo de conseguir una mayor eficacia neuroprotectora. En esta tesis doctoral nos hemos centrado en un glucosaminoglicano que forma parte de la matriz extracelular y que ha mostrado propiedades secuestradoras de radicales libres y antiinflamatorias, el condroitín sulfato.

### **1.2.1. Glucosaminoglicanos (GAGs)**

#### *La matriz extracelular*

La matriz extracelular es una red organizada de materiales extracelulares que pueden adoptar formas diferentes en los tejidos y que está constituida por una variedad de familias moleculares (proteínas versátiles y polisacáridos) (Miyata et al., 2005).

## INTRODUCCIÓN

---

La matriz extracelular es algo más que un material inerte y pasivo; desempeña un papel clave en la forma y actividad celular, influyendo en su desarrollo, su migración y su proliferación (Sherman and Back, 2008).

Una de las principales macromoléculas presentes en la matriz extracelular son las cadenas de polisacáridos de la clase llamada glucosaminoglicanos (GAGs), que cuando se encuentran unidas a proteínas reciben el nombre de proteoglicanos (Sherman and Back, 2008).

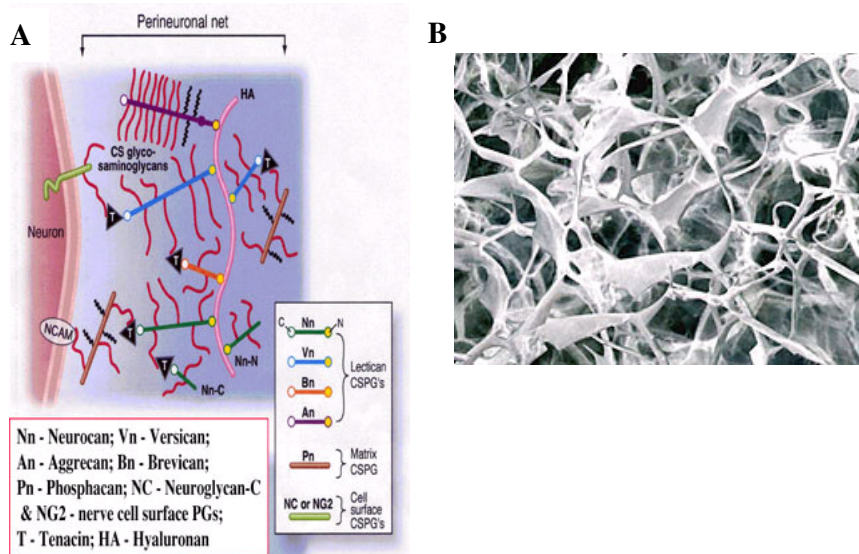
### *Los glucosaminoglicanos*

Los glucosaminoglicanos (GAGs) son cadenas no ramificadas de polisacáridos compuestas por unidades de disacáridos que se repiten (Ruoslahti, 1996). Se les llama GAGs porque uno de los residuos del sacárido en el disacárido repetido es siempre un aminosacárido (N-acetil glucosamina) y el segundo azúcar suele ser un ácido urónico (glucurónico o idurónico)(Campo et al., 2004). Los GAGs, se pueden ilustrar esquemáticamente de la manera siguiente, A-B-A-B-A donde A y B representan un sacárido diferente (Iozzo, 1998). El grado y la distribución del sulfatado de la molécula, junto con la longitud del polímero, determinará las propiedades físicas, químicas y biológicas del glucosaminoglicano (Volpi and Tarugi, 1999).

Los GAGs tienden a adoptar una conformación muy extendida que ocupa un volumen grande en relación con su masa y forman geles (Fig. 9). Las cargas negativas atraen principalmente al  $\text{Na}^+$ , lo que ocasiona que una gran cantidad de agua quede embebida y sea posible la difusión rápida de moléculas hidrosolubles y la migración celular, además de soportar altas cargas compresivas, propiedad muy importante ya que son el componente principal de las articulaciones.

Sin embargo, en el SNC se encuentra un tipo especial de matriz extracelular que se ha denominado ***red perineuronal***. Esta red consta de proteoglicanos de condroitín sulfato y ácido hialurónico (Fig. 9), se asocian a las diferentes poblaciones neuronales en el cerebro de los mamíferos (Miyata et al., 2005).

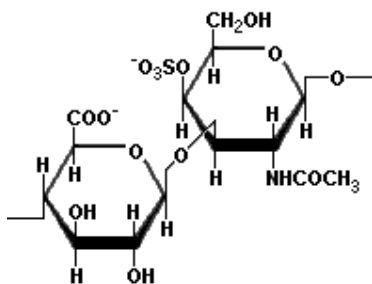
## INTRODUCCIÓN



**Figura 9.** A. Esquema de la red perineuronal. B. Imagen ultraestructural tomada en un microscopio confocal de una matriz de glucosaminoglicanos.

### 1.3. CONDROITIN SULFATO (CS)

El CS es un GAG con alto peso molecular y densidad de carga que compone la matriz extracelular del tejido conectivo, aportándole elasticidad (Reginster et al., 2007).



**Figura 10.** Estructura química del condroitín sulfato.

Es un elemento constituyente del cartílago, tejido en el que se encuentra unido a una proteína central formando un proteoglicano, producto que confiere al cartílago sus propiedades elásticas. La actividad terapéutica de condroitín sulfato en pacientes artrósicos es debida a una actividad antiinflamatoria a nivel de los componentes celulares de la inflamación, a la estimulación de la síntesis de proteoglicanos y ácido hialurónico endógenos y a la disminución de la actividad catabólica de los condrocitos, inhibiendo algunas enzimas proteolíticas (colagenasa, elastasa,

## INTRODUCCIÓN

---

proteoglicanasa, fosfolipasa A2, N-acetilglucosaminidasa, etc.) y la formación de otras sustancias que dañan el cartílago (Bruyere and Reginster, 2007).

El CS ha mostrado distintas propiedades como acción secuestradora de ROS (capta y elimina radicales libres) (Albertini et al., 1999; Campo et al., 2004), regulación del crecimiento neural (Iozzo, 1998; Hayashi et al., 2005), presenta acción analgésica y antiinflamatoria (Monfort et al., 2008) y acción antilipemiente en estudios animales (Williams, 2001).

También hay estudios preclínicos que muestran que el CS posee efectos neuroprotectores, por ejemplo, frente la toxicidad inducida por glutamato (Okamoto et al., 1994a) o por aminoácidos excitatorios (Okamoto et al., 1994b). El efecto antioxidante del CS se ha demostrado ampliamente. Así, la red perineuronal, constituida en su mayoría por CSPGs que interactúan con ácido hialurónico y tenascina, y que rodea a las neuronas, protege a las neuronas del estrés oxidativo (Morawski et al., 2004). Los cultivos de fibroblastos de piel humana ven reducido el daño provocado por distintos agentes oxidantes cuando se tratan con CS (Campo et al., 2004).

Los mecanismos propuestos para explicar las acciones antioxidantes de los GAG son variados. Así, se ha descrito que la presencia del grupo carboxilo en el residuo del ácido glucurónico, es capaz de quelar iones como el calcio (Cael et al., 1978) e iones metálicos como el cobre (Dunstone, 1960) y el hierro, que son responsables del inicio de las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss. El grupo sulfato del C4S en el residuo de galactosamina también puede interaccionar con cationes metálicos (Cael et al., 1978).

Arai y colaboradores (Arai et al., 1999), proponen que la descomposición de los GAG por los ROS, produciendo moléculas neutralizantes, pueden actuar como secuestradores de radicales libres con la consecuente reducción de su actividad oxidante.

Una actividad secundaria del CS puede ser un efecto antiinflamatorio provocado por quelación de metales de transición o por secuestro de ROS. Hay evidencias que relacionan directamente la presencia de GAG con una disminución en la producción de citoquinas por la vía NFκB en condrocitos (Campo et al., 2008b). Los mecanismos propuestos para este fenómeno incluyen la interacción del grupo sulfato del carbono 4 del CS directamente con el factor nuclear, y el hecho de que el CS *per se* sea capaz de



## INTRODUCCIÓN

---

secuestrar quimioquinas provocando un efecto inmunosupresor, y a su vez, disminuyendo la concentración de quimioquinas que puedan activar la vía NF $\kappa$ B.

Para su comercialización, el CS se extrae a partir de material cartilaginoso de bovino, porcino y también cartílago de tiburón, así que su formulación está influida por las estructuras y las características del material de origen (Volpi and Tarugi, 1999b; Prydz and Dalen, 2000).

En la actualidad el CS es un fármaco indicado en el tratamiento sintomático de la artrosis, debido a sus propiedades antiinflamatorias y condroprotectoras. En esta tesis nos hemos propuesto estudiar si el CS posee los efectos antiinflamatorios y protectores a nivel del sistema nervioso central.

## OBJETIVOS

---

---

## OBJETIVOS

---

### OBJETIVOS DE ESTA TESIS DOCTORAL

La hipótesis que nos planteamos en esta tesis, se encuadra en la necesidad de encontrar fármacos que puedan actuar en varias etapas de la cascada isquémica, interviniendo en los procesos que dañan las células en fases que aún sean reversibles, o directamente inhibiendo los procesos que llevan a la muerte celular. En definitiva encontrar posibles fármacos neuroprotectores frente a isquemia. Con este fin, nos planteamos los siguientes objetivos:

⌚ Estudiar el efecto antioxidante del condroitín sulfato en modelos de estrés oxidativo endógeno y exógeno en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, explorando las vías por las que estaría actuando.

⌚ Evaluar los el efectos antiinflamatorios del CS en un modelo de neuroinflamación provocada por LPS en astrocitos de rata, e investigar las vías implicadas.

⌚ Comprobar el papel neuroprotector del CS en un modelo de isquemia *in vitro* como son las rodajas de hipocampo de rata sometidas a POG y ver las rutas intracelulares por las que actuaría.

⌚ Investigar la acción neuroprotectora del CS en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral global en el jerbo.



Este trabajo de investigación se ha realizado empleando distintos modelos experimentales: una línea celular humana de neuroblastoma, ratas macho Sprague-Dawley tanto adultos, 250-325 g como neonatos de 2-3 días, y jerbos macho adultos (*Meriones unguiculatus*) peso 60 a 80 g. Las ratas procedieron del Gabinete Veterinario de la UAM, con n° de registro EX021-U. Los jerbos fueron suministrados por el centro de cría Janvier (Francia) y fueron estabulados en el animalario.

Todos los animales cumplieron la legislación vigente (Directiva Europea 609/86 y Real Decreto 1201/2005). Los experimentos que han requerido la utilización de animales fueron aprobados por la Comisión de Ética de la UAM. Y, todos los procedimientos empleados en los animales han sido supervisados por el personal veterinario de la Facultad de Medicina de la UAM y el Hospital Universitario La Paz.

A continuación se detalla cada uno de los modelos y procedimientos experimentales empleados:

### 2.1. CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY 5Y

El uso de líneas celulares para el estudio de modelos de muerte celular y neuroprotección se ha convertido en los últimos años en una alternativa a la utilización de los cultivos primarios neuronales, y en particular la línea que hemos utilizado se emplea habitualmente como modelo para estudiar rutas de señalización y mecanismos de muerte neuronal. En concreto, las vías activadas por estímulos de estrés oxidativo que como se ha mencionado anteriormente son una de las principales vías que provocan muerte celular en la patología isquémica. En este trabajo se han empleado células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, que fueron cedidas generosamente por el centro de Biología Molecular (CBM).

#### 2.1.1 Cultivo y mantenimiento.

Las células SH-SY5Y se cultivaron en monocapa en un flask de 75 cm<sup>2</sup> con tapón ventilado. El medio de cultivo utilizado ha sido DMEM alto en glucosa (4.5 mg/l), suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-Glutamina, y una combinación de antibióticos: 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina.

Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a 37°C en humedad, con un 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de aire. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana haciendo pases 1:4 cuando las células llegaban al 70-80% de confluencia. Para realizar los pases, las células se despegaron mediante su tratamiento con Tripsina-EDTA.

Para valorar la apoptosis por citometría de flujo las células se sembraron en placas de plástico de 60 mm de diámetro ( $1.75 \times 10^6$  células/placa) y se mantuvieron 24 horas antes de empezar el experimento. Cuando se valoró la viabilidad mediante la determinación de LDH, las células se sembraron en placas de 48 pocillos a razón de 80.000 células/pocillo

Cuando se valoró fluorescencia en un lector de placas, las células se sembraron en placas estériles de 96 pocillos con paredes opacas a una densidad de  $10^5$  células por pocillo. También se dejaron pasar 24 horas antes de empezar los experimentos.

### **2.1.2. Fármacos y tratamientos**

Las células se incubaron en el medio de cultivo DMEM durante 24 h con distintas concentraciones de CS; y a continuación se incubaron otras 24 h con el compuesto en presencia del estímulo tóxico (agua oxigenada 100  $\mu$ M ó Rotenona 10 $\mu$ M + Oligomicina-A 1 $\mu$ M). Se evaluaron varias concentraciones de CS (0.3, 1, 10, 60, 100, 600 y 1000  $\mu$ M), y 3 concentraciones de trolox (3, 30 y 300 $\mu$ M) como control de fármaco secuestrador de radicales libres. (Albertini and Abuja, 1999). También hemos utilizado ácido hialurónico (HA) a 10  $\mu$ M para comparar los efectos de otro GAG con los del CS.

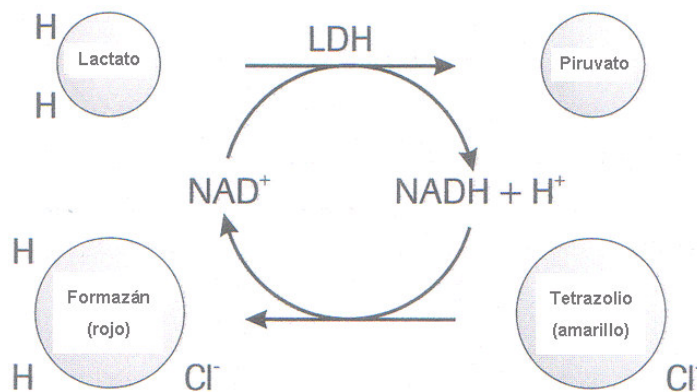
### **2.1.3. Medida de la Lactato Deshidrogenasa (LDH)**

Cuantificamos la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de incubación como marcador general del daño celular. (Koh and Choi, 1987). (Fig. 11).

Una de las características generales que definen la muerte celular está íntimamente relacionada con la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. La LDH es una enzima citoplásmica estable que, ante alguna agresión que cause esa falta

de integridad en la membrana celular, sale al medio externo. De ésta forma podemos realizar una medida indirecta del estado de la célula, comparando la actividad de la LDH liberada al medio extracelular con respecto a la LDH intracelular (aquella que aún permanece en el interior de las células viables). Este segundo parámetro lo obtenemos al incubar las células con una mezcla de agua y 0.1% de Tritón-X100 durante 20 minutos para asegurar la liberación total de la LDH que permanecía en las células no dañadas, ya que el efecto del detergente va a provocar la rotura de las membranas todavía intactas.

La valoración de esta enzima se ha realizado mediante un kit comercial (Cytotoxicity detection kit-LDH; Roche). Para ello, las células se sembraron en placas de 48 pocillos ( $10^5$  células/pocillo), se mantuvieron en el incubador durante 24 h antes de iniciar el experimento, tiempo suficiente para facilitar la adhesión de las células a la superficie de la placa de cultivo. Posteriormente, siguiendo el protocolo, se expusieron a los diferentes tratamientos. Las muestras se analizaron colorimetricamente en un lector de placas (Labsystems iEMS Reader MF), empleando el filtro adecuado a 490-600 nm y obteniendo los valores de absorbancia.



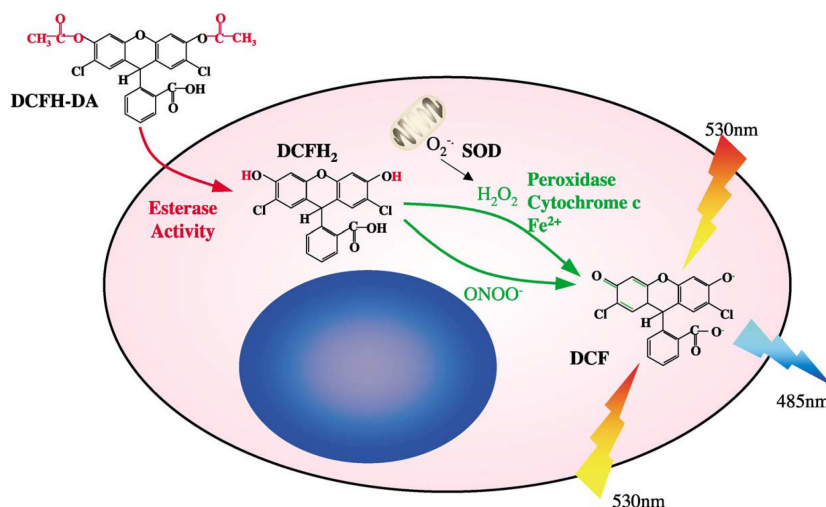
**Figura 11:** Principio del ensayo de detección de citotoxicidad a través de la valoración indirecta de la actividad de la enzima LDH.

Consideramos la actividad total de la LDH como la suma de las actividades de la LDH intra y extracelular. Definimos LDH liberada como el porcentaje de la actividad de la LDH extracelular comparada con la total.

### 2.1.4. Valoración de la formación de radicales libres mediante el empleo de la sonda fluorescente DCFDA

Para determinar la producción de radicales libres hemos utilizamos la sonda fluorescente 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato. (DCFDA). Se trata de molécula relativamente no fluorescente que difunde libremente a través de la membrana celular y es muy sensible a los cambios redox intracelulares de tal manera que cuando en el interior celular se generan radicales libres se observa un aumento de la fluorescencia intracelular.

Cuando esta sonda pasa al interior celular, las esterasas intracelulares hidrolizan la sonda convirtiéndola en DCFH<sub>2</sub>. Las peroxidasas, el citocromo C y el Fe<sup>2+</sup>, pueden oxidar la sonda a DCF en presencia de peróxido de hidrógeno y la acumulación de DCF en la célula se puede medir como un incremento de fluorescencia a 530 nm cuando se excita a 485 nm (Fig. 12).



**Figura 12:** Esquema que representa el mecanismo de acción de la sonda fluorescente DCFDA, sensible a los radicales libres.

Así, hemos tratado las células SH-SY5Y con los agentes productores de radicales libres (agua oxigenada o rotenona + oligomicina) en presencia y/o ausencia de CS y hemos tomado fotografías en un microscopio de fluorescencia. De esta manera hemos obtenido una información cualitativa de la producción de radicales libres con los distintos tratamientos.

En otra serie de experimentos las células SH-SY5Y sembradas en placas negras de 96 pocillos, se determinó la fluorescencia total en cada pocillo tras tratar las células



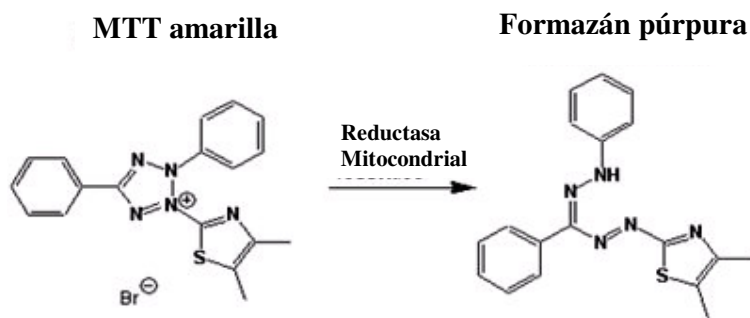
con agua oxigenada o rotenona + oligomicina en presencia o ausencia de CS. En estos experimentos, las células se incubaron con CS durante 24h y al día siguiente se preincubaron con la sonda fluorescente DCFDA durante 45 minutos. Tras este tiempo se cuantificó la fluorescencia basal de cada pocillo. A continuación, se añadió el generador de radicales libres (agua oxigenada u oligomicina + rotenona) en presencia o ausencia de CS (600 $\mu$ M y 100 $\mu$ M respectivamente), con el objeto de medir el incremento de fluorescencia ocasionada por los distintos tratamientos. A cada pocillo se le restó su fluorescencia basal para obtener la fluorescencia neta.

### 2.1.5. Valoración de la reducción de MTT

Cuantificamos la capacidad reductora celular utilizando la sal de tetrazolio MTT, como medida indirecta de la viabilidad global (Mosmann, 1983) (Fig. 13).

Esta técnica mide la capacidad reductora mitocondrial, con la cual podemos averiguar el estado general de la célula. La sal de tetrazolio MTT es internalizada en las células, y sólo aquellas que siguen siendo viables son capaces de reducir dicha sal transformándola a formazán, un producto insoluble y coloreado que se deposita en el exterior celular.

La MTT se añadió en cada pocillo a una concentración final de 0,5 mg/ml en una solución de Krebs-HEPES (en mM: NaCl, 144; KCl, 5,9; MgCl<sub>2</sub>, 1,2; CaCl<sub>2</sub>, 2; HEPES, 10; glucosa, 11; a pH 7,3), y se incubó a 37°C. Transcurridas 3 horas, se retiró el medio y el formazán precipitado en la solución se disolvió con dimetilsulfóxido. Se analizó la absorbancia en un lector de placas (Labsystems iEMS Reader MF), a 500 nm. Los datos se representaron tomando como el 100% de viabilidad el resultado de las células control.

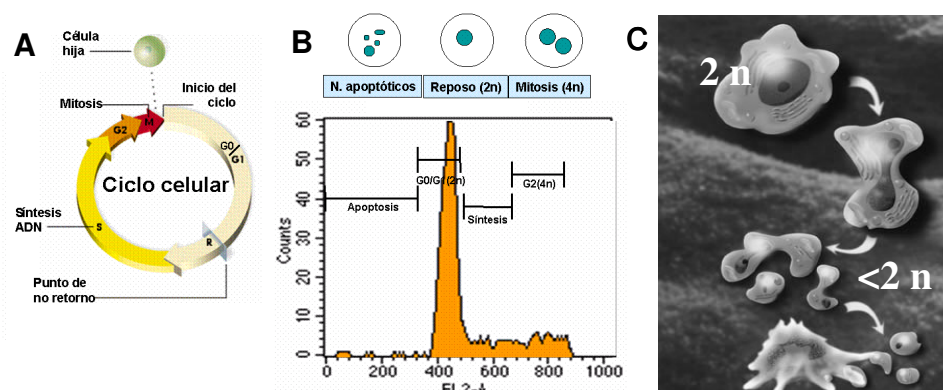


**Figura 13:** Principio del ensayo de valoración de la viabilidad a través del análisis indirecto del estado mitocondrial celular.

### 2.1.6. Fragmentación del ADN y estudio del ciclo celular por citometría de flujo

Cuando la muerte celular acontece por la vía apoptótica, el ADN se fragmenta, dando como resultado una población de células con un contenido de ADN inferior al diploide característico de una célula en reposo (Nicoletti et al., 1991) (Fig. 14C). La citometría de flujo, nos permite analizar la cantidad de ADN presente en cada célula, y así separar las poblaciones dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentren, así como detectar anomalías en la carga genética.

En estado de reposo, (no estando en división), las células somáticas tienen un contenido genético diploide ( $2n$ ), en este estadio se dice que están en la fase  $G_0/G_1$  del ciclo celular. Durante la fase S, el ADN empieza a replicarse, lo que conlleva un incremento progresivo de la carga genética hasta llegar a  $4n$  al final de esta fase, que se mantiene durante la fase  $G_2$  y hasta la fase M, cuando la célula se divide físicamente y da lugar a dos células hijas de contenido diploide cada una (Fig 14A).



**Figura 14:** A. Esquema representativo del ciclo celular B. Registro típico del análisis del ciclo celular por citometría de flujo en células control teñidas con yoduro de propidio que nos permite detectar el número de eventos en cada una de las fases. C. Esquema de la apoptosis celular

Una de las sondas más empleadas para determinar la cantidad celular de ADN es el yoduro de propidio, una sustancia rojo-naranja fluorescente que se intercala en los ácidos nucleicos de doble cadena. La cantidad de fluorescencia emitida es proporcional al contenido de ADN de cada célula. En las células apoptóticas, la ruptura internucleosomal del ADN se registra como un pico hipodiploide (carga genética inferior a  $2n$ ) (Nicoletti et al., 1991) (Figs. 14 B y C).

La apoptosis se cuantificó analizando el contenido de ADN en las distintas fases del ciclo celular en células teñidas con yoduro de propidio. Las células se recogieron en tampón fosfato frío (PBS), se centrifugaron (800 rpm durante 10 minutos) y se fijaron en etanol (70%) a 4°C durante 1 h. Posteriormente, se lavaron con PBS y se marcaron con una solución de yoduro de propidio (Molecular Probes) (20 µg/ml) y RNAsaA (Sigma) (0,2 mg/ml) durante 30 min a temperatura ambiente.

Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur; (BD Biosciences, San Jose, CA). El primer paso de este análisis fue seleccionar nuestra población (R1) por tamaño y complejidad. En esta población seleccionada, representamos el diagrama FL2-área del pico de fluorescencia (FL2-A) frente a FL2-anchura del pico de fluorescencia (FL2-W) para eliminar los dobletes y restos de asociaciones celulares (R2). El estudio del contenido de ADN se realizó en las células de esta región R2. En estas partículas individuales se cuantificó la intensidad de fluorescencia del yoduro de propidio, para estimar la cantidad de ADN de esta partícula, y la representamos en un diagrama de frecuencias. En esta gráfica se representa el número de células frente a la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio unido al ADN.

La apoptosis se cuantificó como el porcentaje de partículas con un contenido de ADN inferior a 2n. Las células con dotación cromosómica inferior a 2n se distribuyeron a la izquierda, correspondiendo a las células que han sufrido fragmentación del ADN y, por tanto, apoptosis. El programa informático utilizado, CellQuest, nos permite cuantificar el porcentaje de células, del total de la población analizada (5000 células por cada variable experimental), que se distribuye en cada fase del ciclo celular y también las células apoptóticas.

### **2.1.7. Determinación de proteínas por western blot**

Para hacer la cuantificación del cambio en la expresión de proteínas originado por la aplicación de estímulos a las células, utilizamos la técnica del western blot. El día anterior a la recogida de células, éstas fueron privadas de suero, ya que interfiere con el estado basal de activación de las quinasas.

Las células SH-SY5Y ( $5 \times 10^5$ ), sembradas en placas petri de 60 mm de diámetro, fueron lavadas con PBS frío, levantadas y recogidas en un tubo Falcon. Después se lisaron con 100 µl de buffer de lisis frío (1% Nonidet P-40, 10% glicerol, 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 µg/ml leupeptina, 1 mM

fenylmethylsulfonyl fluoruro, 20 mM NaF, 1 mM sodio pirofosfato, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y una pastilla de inhibidores de proteasas-Complete cocktail tablets, Roche). Se incubaron durante 30 minutos en hielo agitándolas con el vórtex cada 10 minutos. Después se centrifugaron y se descartó el pellet, utilizando solo el sobrenadante donde se encuentran disueltas las proteínas. Se cuantificó la proteína total (BCA Protein Assay Kit; Pierce), y se hicieron los cálculos para utilizar 30µg de proteína por grupo.

El protocolo que utilizamos a partir de aquí, está ampliamente descrito (Laemmli, 1970). Se utilizaron geles de poliacrilamida de porcentaje variable, según la proteína a cuantificar (6-12%). Se utilizó un tampón de carga con glicerol al 10%, beta-mercaptoetanol, azul de bromofenol, Tris-HCl y SDS al 2%. Como marcador de peso molecular utilizamos ColorBurst™ de Sigma-Aldrich. Tras la electroforesis, que separó las proteínas según su peso molecular, se transfirieron a membranas de PVDF de Millipore, a 70 mA durante 2 horas a 4 °C.

Las membranas se bloquearon con 5% de BSA disuelta en TBS-T (10mM Tris, pH 7.4; 150mM NaCl; 0.2% Tween-20), para evitar uniones inespecíficas, durante 2 horas. Seguidamente se incubaron las membranas con sus correspondientes anticuerpos primarios en TBS-T: anti-AKT-total (1:1000), anti-fosfo-AKT (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA); anti-HO-1 (1:1000) (Chemicon International, Temecula, CA); anti-β-actin (1:100.000) (Sigma), y los secundarios conjugados a peroxidasa que correspondían (1:10,000) (Santa Cruz). Se revelaron por medio de ECL (enhanced chemiluminescence) en el cual la peroxidasa cataliza la oxidación del reactivo luminol en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La cuantificación de bandas se realizó mediante densitometría usando el programa de análisis de imagen del Scion Image 4.0.3.2.

### **2.2. ASTROCITOS PRIMARIOS DE CORTEZA DE RATA**

Los astrocitos representan la población de células gliales más abundantes del cerebro, constituyendo más del 50% del total celular de la corteza cerebral. Santiago Ramón y Cajal los describió como células de formas estrelladas con un soma circunscrito al núcleo del cual parten una serie de prolongaciones en sentido más o menos radial. Estudios ultraestructurales han revelado la presencia de numerosos microtúbulos y microfilamentos en el citoplasma que se han denominado gliofilamentos. Uno de los gliofilamentos más importante, que se encuentra presente en

el soma y en las prolongaciones es la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), cuya presencia permite, por estudios inmunocitoquímicos y de microscopía electrónica identificar la presencia de este tipo celular glial (Ramirez-Exposito and Martinez-Martos, 1998)

En un principio, se consideró a los astrocitos como un elemento de soporte pasivo de las neuronas. Sin embargo, posteriormente se les ha atribuido un papel mucho más importante en la función y disfunción cerebral. Proporcionan los nutrientes metabólicos necesarios a las neuronas, a sus dendritas y sinapsis, mantienen estable el pH extracelular, ya que eliminan el CO<sub>2</sub> que generan las neuronas como resultado de su metabolismo aeróbico. También modulan la concentración extracelular de ciertos neurotransmisores, principalmente del glutamato (Seki et al., 1999), y controlan los gradientes iónicos dependientes de energía (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>). Están implicados en el control de la barrera hematoencefálica, y desempeñan un papel neuroprotector frente a los ROS.

La membrana de los astrocitos contiene multitud de receptores para aminas, neurotransmisores, citoquinas..., también poseen multitud de transportadores para sustancias neuroactivas que activan rutas intracelulares como la de las MAPK. (Malarkey et al., 1995).

### **2.2.1. Cultivo y mantenimiento celular**

Para realizar cultivos primarios de astrocitos de corteza de rata, utilizamos neonatos macho de 2-3 días de edad. Los neonatos se decapitaron e inmediatamente se les practicó una craneotomía para extraer ambas cortezas. Las cortezas se depositaron en una placa de Petri con PBS frío. Bajo una lupa microscópica se extrajeron las meninges de cada corteza. Una vez limpias, se sumergieron en DMEM frío y se realizó una disección mecánica con unas tijeras de microcirugía. Se pasaron a un tubo Falcon de 50 ml y se realizó una disgregación mecánica pasando la mezcla por pipetas de cada vez menor tamaño (10 ml, 5 ml, y por último por una pasteur de vidrio), con pipeteador automático, 10 veces por cada una para completar la homogenización. Se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos, y se decantó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en DMEM con 20% de SBF y una mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina).

Por último, se pasó por un filtro de 70 µm y se sembraron en flask de 75 cm<sup>2</sup> con tapón de filtro aireado. Se hizo el cálculo de un flask (15 ml de medio) por cada neonato.

### **2.2.2. Subcultivo para obtención de cultivos de astrocitos puros**

El medio de cultivo se sustituyó a los 3 días por un DMEM con 10% de suero y los mismos antibióticos. Al cabo de una semana, se le añadió a cada flask 4  $\mu$ M de ARAC (citosina arabinosido), que es un antimetabolito que actúa como un antagonista de pirimidina. Su actividad es básicamente la de interrumpir la síntesis del ADN, y esto afecta especialmente a la microglia presente en el cultivo.

Tras 3 días de incubación con este inhibidor del crecimiento celular, los flask se agitaron a una velocidad de 250 rpm en un agitador horizontal dentro de una estufa a 37°C.

Transcurridas las 3 horas, se les retiró el medio y se sustituyó por una mezcla de tripsina (0.25% EDTA) PBS 1:5.

Al retirar el medio, se retira la microglia que se despegas con el agitado.

Se dejaron a 37°C unos minutos para que la tripsina actuara. Se observaron al microscopio, y cuando adoptaron una forma redondeada o se despegaron, se les añadió una mezcla de FBS PBS 1:5, para bloquear los efectos enzimáticos de la tripsina.

Se recogió el medio de cada flask y se llevó a tubos Falcon de 50 ml, se centrifugaron 5 minutos a 1.000 rpm y se decantó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en DMEM con 10% de FBS y antibióticos, y se contaron las células para su posterior siembra.

### **2.2.3. Protocolo de incubación de fármacos**

El estímulo tóxico utilizado en todos los experimentos con estas células fue el LPS, que activa las rutas inflamatorias del astrocito. Se administró 10  $\mu$ g/ml de LPS, y se co-aplicó con el fármaco a estudiar, el CS a 10 $\mu$ M. Estos tratamientos se dejaron 2, 4, 6, o 24 horas, dependiendo del protocolo experimental.

### **2.2.4. Determinación de proteínas por western blot**

El protocolo utilizado en astrocitos es idéntico al utilizado en las células de neuroblastoma. Solo se diferencia en que hay que esperar 3 días desde la siembra del subcultivo para poder utilizar los astrocitos. Los anticuerpos utilizados con estas células fueron: anti p65 (santa cruz), anti alfa-actina (Sigma), anti iNOS (cell signalling), anti-TBP (Abcam), anti COX-2 (cayman chemical company).

### **2.2.5. Inmunocitoquímica de p65**

Para esta técnica, los astrocitos se sembraron en placas de 12 pocillos con cubres de cristal. El cristal se trató con polilisina 1 X durante 30 minutos y se aclaró 3 veces antes de proceder a la siembra.

Se sembraron 2 ml ( $6 \times 10^4$  cél/ml) por pocillo, y se esperó un día para empezar el tratamiento. Se co-aplicaron LPS 10 µg/ml con CS 10 µM. Una vez transcurrido el tiempo de incubación con los fármacos, se les retiró el medio, se hicieron 3 lavados con PBS frío y se fijaron las células con PFA al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Tras otros 3 lavados con PBS, se permeabilizaron las células con Tritón al 0.2 % en PBS frío. Se realizó otro lavado con PBS, y se bloquearon con PBS + suero de cabra al 3% durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las células se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo anti p65 (1:250) con suero de cabra al 1%. Al día siguiente se hicieron 2 lavados y se incubó 1 hora con un secundario anti-rabbit fluorescente en verde. Al final, se retiró el medio, se añadió PBS frío y se tomaron fotografías con un microscopio de fluorescencia a 20 X. Después se siguió el mismo protocolo para el anticuerpo anti GFAP, pero el secundario anti-ratón conjugado fue con fluorescencia roja. Por último, se incubó en una solución con Hoechst 15 minutos para teñir los núcleos celulares.

Para la caracterización del cultivo de astrocitos, se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente, pero incubando solo con GFAP y Hoechst.

### **2.2.6. Determinación de citoquinas por RT-PCR**

Se hizo la extracción de RNA de los astrocitos por el método del fenol, con todo el material libre de RNAsa. El día anterior, se les retiró el medio a las placas y se dejaron toda la noche a -80°C. Se añadió a cada placa 1 ml de solución de fenol y se levantaron las células llevando la mezcla a un eppendorf (en frío). Se añadió 400 µl de cloroformo/ isoamil, se mezcló y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se crearon dos fases, se tomó la superior (acuosa), con cuidado de no arrastrar la de abajo. Se repitió el proceso. Una vez obtenida la segunda fase, se añadió una proporción 1:1 de isopropanol, se agitó suavemente, y se dejó precipitar 1 hora a -20°C. Se centrifugó a 4°C a 12000 rpm durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante por decantación. El pellet se resuspendió en 1 ml de etanol al 70%. Se agitó en vórtex y se

centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm a 4°C. Se decantó el etanol y se secaron totalmente antes de resuspender en 30 µl de agua miliQ estéril.

La cuantificación se hizo por medida directa de absorbancia a 260/280 nm en un espectrofotómetro nanodrop®.

La amplificación de 500 ng de ARN se realizó por retrotranscripción, (65°C 5 min., se le añadió la retrotranscriptasa, 10 min a 25°C, 50 min a 50°C y 5 min a 85°C) llevándolo a un volumen final de 15,20 µl.

Para hacer el análisis de la RT-PCR, se utilizó un sistema MyiQ5 iCycler system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Las condiciones térmicas de anillado fueron como sigue: la desnaturalización inicial a 95 °C 3 min., seguido de 40 ciclos de 95 °C 15 s y 60 °C durante 1 min. Durante cada paso de anillado fueron recogidas medidas de fluorescencia. Al final de cada PCR corrida, los datos fueron analizados automáticamente por el sistema y se obtuvieron gráficas de amplificación. Para cada PCR, se añadieron 3 µl de cDNA molde, que fue añadido a 12 µl de IQ™ SYBR-Green Supermix 2X (Bio-Rad) y al que se añadieron los oligómeros F y R para TNF-alfa, IP-10, SOCS, y actina, que fue usada para preparar las curvas patrón de la RT-PCR. Todas las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo por duplicado, y el número de duplicados del ciclo umbral medio ( $C_t$ ), fueron utilizados para calcular el nivel de expresión (número de copias) de las citoquinas, utilizando como estándar la curva generada por la actina. (Lai et al., 2003)

### **2.2.7. Obtención de extractos nucleares para determinar p65.**

Se lavaron las placas petri con PBS hasta que desaparecieron los restos de medio de cultivo. A continuación se levantaron las células y se recogieron en tubos Falcon de 15 ml. Se centrifugaron a 1000 rpm 5 minutos a 4°C.

Se resuspendió el pellet en 1 ml de buffer hipotónico de lisis (Cellytic Nuclear Extraction Kit, SIGMA), pipeteando 10-20 veces. Se transfirieron las suspensiones a eppendorfs. Se dejaron en hielo durante 15 min. Se centrifugaron a 2300 rpm 5 minutos a 4°C. Se decantaron los sobrenadantes y se resuspendieron los pellet en 400 µl de buffer de lisis. Se disgregaron (5 pases) con una jeringa de 1 ml con una punta 25G.

Se centrifugaron 20 minutos a 4°C a 11000 rpm. En el sobrenadante quedaron las proteínas citoplasmáticas que se recogieron aparte. Se resuspendieron los pellets en



140 µl de buffer de extracción del kit. Se dejaron 40 minutos en la cámara fría en un agitador rotatorio, se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C 5 minutos.

Del último sobrenadante, se determinó la concentración de proteína y se determinó por western blot la cantidad de p65 en la fracción nuclear y citosólica, y así poder determinar la cantidad de proteína traslocada al núcleo celular.

### **2.3. RODAJAS DE HIPOCAMPO DE RATA**

Ante el problema ético que plantea el salto experimental que sucede del *in vitro* al *in vivo*, el modelo de rodajas de hipocampo de rata supone una alternativa eficiente para remedar un insulto isquémico en el cerebro, y poder ajustar las dosis de los fármacos que se quieren estudiar antes de administrarlos en animales.

El hipocampo es la estructura cerebral más sensible al daño isquémico, ya que las neuronas piramidales de la capa CA1 se ven muy afectadas por la falta de oxígeno y glucosa y sufren un rápido deterioro con la consecuente pérdida de funcionalidad y, en un alto porcentaje, su muerte.

La rápida alternancia de gases en la solución de burbujeo sustituye de manera muy eficiente el oxígeno por nitrógeno, y al cambiar en el líquido de las rodajas la glucosa por la 2-Deoxiglucosa (fármaco análogo no metabolizable de la glucosa), llegamos a una situación en la que el tejido se somete a una privación de oxígeno y glucosa.

Las ventajas que ofrece este modelo son por una parte que el tejido, a diferencia de los cultivos celulares, mantiene la estructura fisiológica con las neuronas, la glia y los vasos sanguíneos. Al conservar los vasos, cuando comienza la re-oxigenación del tejido, se crean muchos radicales libres al contacto con el oxígeno, lo cual acarrea incluso más daño a las neuronas que el haber estado anóxicas. Esto también ocurre en las isquemias fisiológicas cuando van seguidas de la reperusión del tejido. Así, una de las agresiones más importantes que sufre el tejido es el ataque de radicales libres de oxígeno.

### **2.3.1. Obtención de las rodajas de hipocampo de rata**

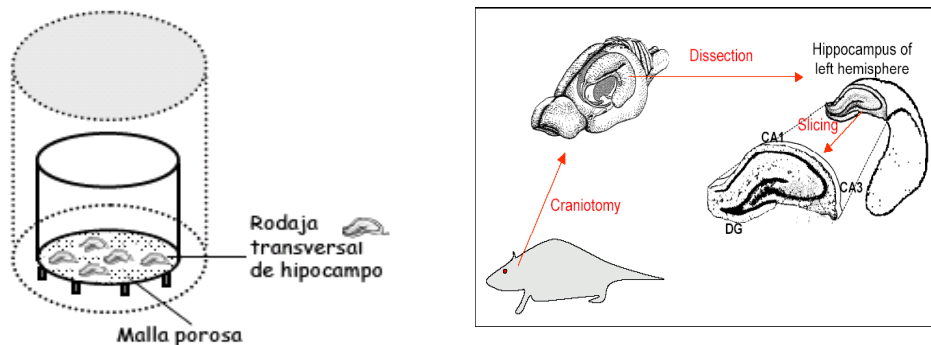
Las ratas macho se sacrificaron mediante la inyección intraperitoneal de 60 mg/Kg. de pentobarbital sódico (Euta-Lender®). Se decapitaron con guillotina y se practicó una craneotomía para extraer el cerebro entero. El cerebro se sumergió inmediatamente en solución de disección, un Krebs-Henseleit modificada en frío (4°C), a pH 7.4 cuya composición es: NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18 mM, glucosa 11 mM y sacarosa 200mM (Moro et al., 2000).

La sacarosa hace que la solución sea hipertónica, impidiendo así el edema celular. Todas las soluciones son burbujeadas con 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> ó 95% N<sub>2</sub> -5% CO<sub>2</sub> de forma que queden saturadas de oxígeno, o que carezcan de él por completo, antes de sumergir las rodajas.

Los hipocampos se aislaron rápidamente para su disección y se embebieron en agarosa de bajo punto de fusión al 2% (Sigma-Aldrich). Se colocaron en posición vertical contra un bloque de agar en una cámara, sumergidos en el krebs de disección frío y oxigenado y se realizaron rodajas trasversales de 350 µm en un vibratomo (Leica VT1000S) (Fig.15).

Los parámetros de corte fueron 0.5 mm/s de velocidad, 60 Hz de frecuencia y 0.8 mm de amplitud. Todos lo experimentos incluyeron un grupo basal y un grupo POG y, se evaluó de forma paralela hasta un máximo de tres concentraciones del fármaco por experimento. Inmediatamente tras el corte en el vibratomo, las rodajas (las dos más anteriores se descartaron) se transfirieron a un vial con Krebs de disección sin sacarosa, burbujeadado con 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>, a temperatura ambiente durante 60 minutos, para que las neuronas que hubieran resultado dañadas en el proceso de corte liberen la LDH al medio y luego no interfiera con las mediciones con los tratamientos (periodo de equilibrio).

Las rodajas se sumergieron completamente y se colocaron sobre una malla porosa para protegerlas del burbujeo (Fig. 15).



**Figura 15:** Esquema de las rodajas de hipocampo de rata, y el material experimental utilizado para la POG.

### 2.3.2 Privación de oxígeno y glucosa (POG) y tratamientos con los fármacos

En el periodo justamente posterior al de equilibrado, se realizó una preincubación de las rodajas, de 30 minutos, con los fármacos. El grupo basal y el grupo control POG, se preincubaron sin fármaco alguno. Todos los grupos fueron embebidos en una solución Krebs normal (NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.19 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18 mM y glucosa 11 mM), a la cual se le añaden los fármacos correspondientes.

Tras el periodo de preincubación, las rodajas del grupo basal se mantuvieron en la solución Krebs oxigenada hasta el final del experimento, cambiándoles el medio cada 60 minutos a 37°C. Al resto de grupos se les indujo una POG durante 60 minutos embebiéndolas en una solución Krebs bicarbonato sin glucosa, equilibrado con 95% N<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> en el que reemplazamos la glucosa con 2-deoxyglucosa (Sigma-Aldrich).

Tras la hora de POG, se sustituyó esta última solución por Krebs oxigenado y con glucosa (periodo de re-oxigenación), con sus fármacos correspondientes, hasta un periodo de dos horas recogiendo y cambiando el Krebs cada hora. Durante estos experimentos se mantuvo la temperatura a 37°C.

El CS (0.1, 1 y 3 mM) disuelto en agua y la co-incubación CS (3 mM) con LY-294002 (30 μM) se añadieron a las rodajas durante los 30 minutos del periodo de preincubación y durante los periodos de POG y re-oxigenación. El LY-294002 se obtuvo de Tocris (Biogén científica)

### **2.3.3. Medida de LDH**

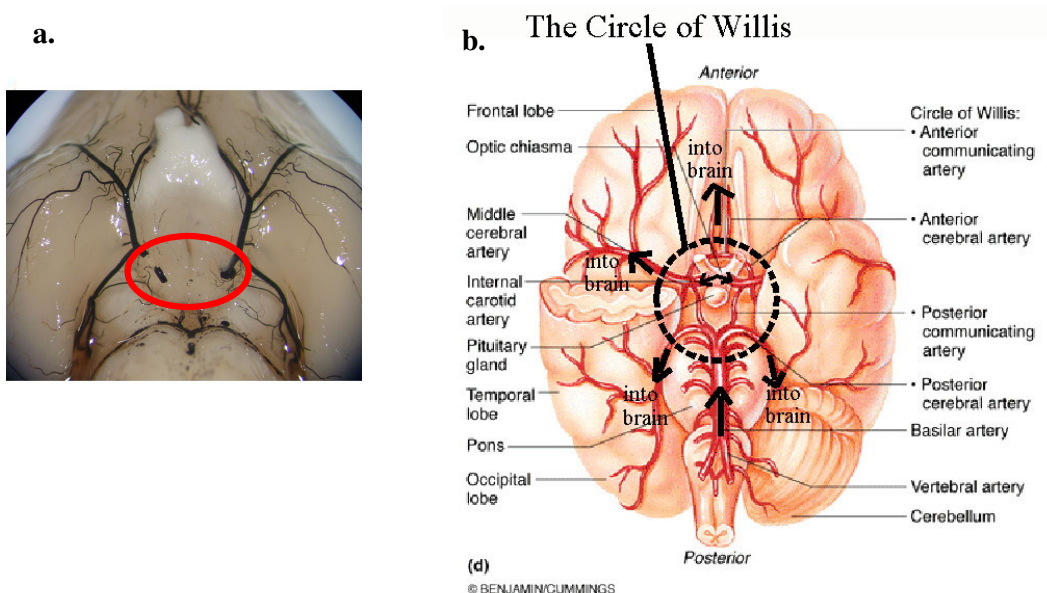
La muerte de las células de las rodajas de hipocampo se cuantificó midiendo la actividad de la enzima citosólica de la lactato deshidrogenasa (LDH; ROCHE) liberada al medio (Koh and Choi, 1987), como se describe en el apartado 2.1.3. La LDH se evaluó inmediatamente después de los 30 minutos de equilibrio, al final de cada periodo, al final de la POG y 1 hora y 2 horas después de la re-oxigenación. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de densidad óptica (DO).

## **2.4. EXPERIMENTOS *IN VIVO***

### **2.4.1. Isquemia cerebral global en jerbo**

Con el fin de investigar sobre los mecanismos fisiopatológicos que entraña la isquemia cerebral y estudiar posible fármacos neuroprotectores y sus mecanismos de acción se torna necesario la utilización de un modelo *in vivo* que nos aproxime sus consecuencias fisiológicas. Para ello, se hace imprescindible el uso de animales de experimentación. Hay modelos de isquemia cerebral permanente y transitoria, estos últimos permiten evaluar los efectos de la reperusión (Durukan et al., 2008).

El gerbillo de Mongolia presenta una anomalía anatómica congénita en el polígono de Willis que consiste en la ausencia de la arteria comunicante posterior, lo que hace que la circulación carotídea sea independiente de la vertebrobasilar (Fig. 16) (Castro-Pacheco et al., 2001). Muchos investigadores han demostrado que aproximadamente 30 a 40% de los gerbos desarrollan un severo déficit del estado neurológico e infarto unilateral después de la oclusión unilateral permanente de la carótida (Kahn, 1972). El modelo del gerbo de oclusión bilateral de las carótidas es muy usado para realizar evaluaciones farmacológicas de medicamentos que realizan protección del daño cerebral (Clifton et al., 1989). Las ventajas de este modelo son la baja tasa de mortalidad, simplicidad de preparación, morbosidad pequeña, y una incidencia alta de la lesión isquémica cerebral. El área CA1 del hipocampo muestra pérdida neuronal severa en 85-95% de los gerbos después de 7 días de oclusión (Kirino, 1982). Es una especie muy utilizada, a pesar de su variabilidad genética, por muchos investigadores en la actualidad (Ishibashi et al., 2003).



**Figura 16.** El polígono de Willis conecta la circulación anterior y posterior del cerebro en humanos (b), pero el jerbo carece de él (a).

Las desventajas de esta especie vienen dadas por las limitaciones en la evaluación neurológica, y la susceptibilidad del gerbo al procedimiento quirúrgico porque los animales son pequeños. (Hossmann, 2006)

### 2.4.2. Grupos de tratamiento.

Los animales se dividieron en 3 grupos aleatoriamente de 4 animales por cada uno. Al grupo CS + isquemia, se le administró por vía intraperitoneal una única dosis, 60 minutos antes de realizar la isquemia, de 10 mg/kg de CS por animal, y luego de forma subcutánea cada 12 horas las 72 horas de perfusión siguientes hasta el sacrificio. En cuanto a los otros dos grupos, a uno de ellos se le realizó la isquemia y se administró suero salino (grupo isquemia), y al otro se le practicó todo el procedimiento operatorio con la excepción de la oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes (grupo simulado).

### 2.4.3. Inducción de la isquemia cerebral global transitoria.

Los animales se anestesiaron por vía inhalatoria en una caja de metacrilato cerrada con el anestésico halotano (2-bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoretano, 615179-H, Astra Zeneca Farmacéutica) al 5% en oxígeno a 3 l/min. Una vez anestesiados de esta forma, se mantuvo la anestesia con una máscara especial que suministraba el halotano al

1.5% en oxígeno a una velocidad de 0.75 l/min. Durante el proceso quirúrgico y la recuperación de la anestesia, la temperatura corporal de los animales se mantuvo a  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  mediante una placa de calor controlada por una sonda rectal (RTC-1 Cibertec, Madrid). Para tener controlada la presión sanguínea arterial, y la frecuencia cardíaca, (monitor de constantes Schiller CM-8) se insertó un catéter de silicona polimérica (Silastic®, Medical Grade Tubing, Dow Corning, Michigan, EE UU) en la arteria femoral derecha.

La cirugía se realizó de la siguiente manera: se realizó una incisión longitudinal ventral, se localizaron las arterias carótidas comunes de ambos lados, cuidando de no lesionar el tronco vagosimpático. Luego se procedió a ocluir las sin interrupción, durante el tiempo establecido para cada animal (5 minutos) con suturas de seda negra de grosor 6/0 (Mersilk, Ethicon) con un lazo. La ausencia de flujo sanguíneo en ambas arterias durante la oclusión se confirmó visualmente, y tras la liberación de las arterias se comprobó el restablecimiento del flujo sanguíneo con un microscopio estereoscópico (Leica Wild-M650), y se procedió a suturar la herida con seda negra de 4/0 de grosor (Mersilk, Ethicon). En los animales simulados, se realizó el mismo procedimiento quirúrgico, excepto que a estos no se les ocluyeron las arterias carótidas comunes.

#### **2.4.4. Estudios histológicos de viabilidad neuronal.**

Siguiendo el protocolo establecido por Kirino y colaboradores (Kirino, 1982), sacrificamos a los animales a las 72 horas de reperusión para poder observar el posible efecto protector del fármaco administrado. Los jerbos se anestesiaron y se perfundieron por vía transcardiaca con una bomba peristáltica (3.5 ml/min) con 100 ml de suero salino, primero, y con 100 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4 después.

Tras la fijación, se extrajeron los cerebros por craneotomía y se mantuvieron en la misma solución de fijación a  $4^{\circ}\text{C}$  48 horas antes de ser embebidos en parafina. A continuación seccionamos los bloquitos de parafina con un microtomo rotatorio (Shandon AS-325-Retraxion) en cortes coronales de 5  $\mu\text{m}$  de grosor donde se incluía el hipocampo dorsal (desde 1.4 hasta 1.9 mm en sentido caudal a bregma, (Loskota et al., 1974). Las láminas de corte del cerebro se colocaron sobre portaobjetos tratados con polilisina, asegurando su fijación al cristal.

### **2.4.5. Tinción con Hematoxilina-Eosina.**

Para evaluar el posible efecto neuroprotector del fármaco, nos centramos en el examen de las neuronas piramidales de la capa CA1 del hipocampo, ya que son las más vulnerables a la lesión por un modelo de isquemia-reperfusión. (Kirino, 1982)

Con el objeto de evaluar la lesión en el hipocampo teñimos los cortes con hematoxilina-eosina con el siguiente protocolo de tinción: se introducen las muestras en xilol durante 10 minutos para desparafinarlas, después se re-hidratan sumergiéndolas en alcoholes de porcentajes diferentes (100°, 90°, 80°, 70°) y por último se lavan con agua destilada. Sumergimos las muestras en hematoxilina de Harris (15 min.), que tiñe de azul las estructuras ácidas (el núcleo de las células). Se lavan 2 veces con agua destilada, y se hicieron 6 pases rápidos en alcohol clorhídrico, un lavado en agua destilada, 4 pases rápidos en agua amoniacal y 4 lavados en agua destilada durante 20 min. Tras esto, se sumergieron las muestras en una solución de eosina-floxina durante 4 min., que tiñe de rosa las estructuras básicas de la célula (el citosol). Por último, las muestras se volvieron a deshidratar en alcohol de 96 y de 100°, se sumergieron en xilol durante 5 min. y se montaron las muestras con DePeX

### **2.4.6. Determinación de la lesión.**

Consideramos la magnitud del daño provocado en el hipocampo, dependiendo del conteo del número de neuronas viables en el *stratum pyramidale* en el área CA1 dorsal con un aumento de 1000X (Zeiss Axioplan) en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina.

Para considerarlas viables, las neuronas no debían de presentar retracción del cuerpo celular o estar picnóticas, y esas no fueron contabilizadas. Se midió la longitud de la capa CA1 con un programa de análisis de imagen (Image ProPlus) para normalizar los datos, y calculamos para cada hemisferio el número de neuronas piramidales viables en CA1 por milímetro de longitud de la misma. Se analizaron dos cortes de cada animal y calculamos la media. El conteo de las neuronas viables en las secciones histológicas se hizo de forma ciega.

## **2.5. PREDICCIÓN DEL PASO DE LA BHE.**

El paso de la barrera hematoencefálica del CS se evaluó empleando un ensayo de permeabilidad a través de una membrana artificial PAMPA (parallel artificial

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

---

membrane permeation assay), siguiendo el procedimiento estandarizado en el laboratorio.

La microplaca receptora se rellenó con 180  $\mu$ l por pocillo de una mezcla compuesta por PBS pH 7.4 y EtOH en proporción 90:10. El filtro de la placa donadora se cubrió con 4  $\mu$ l de una disolución del extracto lipídico de cerebro de cerdo en dodecano (20 mg/ml). A continuación se añadieron 180  $\mu$ l de una disolución PBS:EtOH (90:10) de CS sobre la microplaca donadora, que se situó de forma cuidadosa sobre la placa receptora.

Tras 120 minutos de incubación a 25°C la placa donadora se separó cuidadosamente y se determinó la concentración de los compuestos en la placa receptora mediante espectroscopía UV. Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  desviación estándar de 3 ensayos independientes conteniendo cada uno de ellos cuatro repeticiones.



## RESULTADOS

---

---

### 3.1. EFECTO NEUROPROTECTOR DEL CS EN CÉLULAS SH-SY5Y FRENTE A ESTIMULOS DE ESTRÉS OXIDATIVO

En una etapa inicial, se diseñaron los siguientes experimentos para evaluar si el CS podría ofrecer protección celular ante distintas situaciones de estrés oxidativo. Elegimos los modelos de estrés oxidativo para inducir lesión celular porque los radicales libres de oxígeno se han implicado en multitud de patologías que cursan con muerte neuronal, entre ellas la isquemia cerebral. Tal como se ha detallado en la introducción de esta tesis, la generación de radicales libres durante la fase de re-oxigenación, tras un ictus isquémico, contribuye de una forma importante al daño neuronal.

Como modelo celular se ha empleado la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y y como modelos de estrés oxidativo se han empleado los siguientes: (i) el agua oxigenada como modelo de generación de radicales libres desde una fuente exógena y (ii) el bloqueo de los complejos mitocondriales I y V mediante el empleo de rotenona y oligomicina-A, como modelo de generación de radicales libres desde el interior celular.

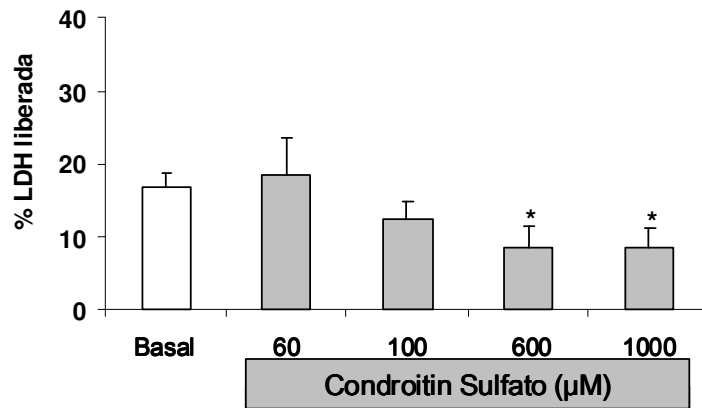
Antes de determinar si el CS sería capaz de proteger frente la lesión celular inducida por los citotóxicos mencionadas anteriormente, evaluamos el efecto de concentraciones crecientes de CS sobre la viabilidad basal. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

#### EFECTO “PER SE” DEL CS EN CÉLULAS SH-SY5Y

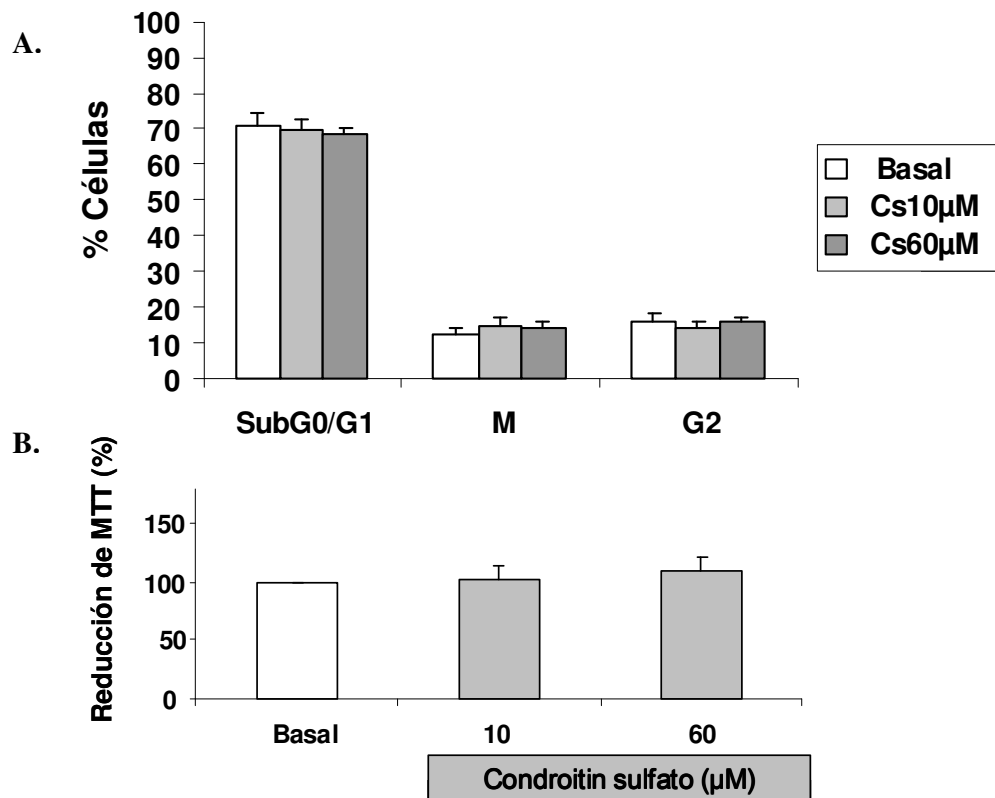
La incubación de las células SH-SY5Y con CS durante 24 horas, en un rango de concentraciones de 0.06 a 1mM, no aumentó significativamente la muerte celular. De hecho, se dio una reducción significativa de la muerte celular basal en las concentraciones de 0.6 a 1mM ( $p < 0.01$ ;  $n=4$ ) (Fig. 17).

Sin embargo, el pre-tratamiento durante 48 horas con CS 60  $\mu$ M no modificó la tasa de proliferación celular cuando se analizó el ciclo celular mediante citometría de flujo en células marcadas con yoduro de propidio, (Fig. 18A) o utilizando el marcador de proliferación celular MTT (Fig. 18B). Estos datos sugieren que la reducción de la viabilidad observada por el CS no se debe a modificaciones que pudiera ocasionar sobre el ciclo celular, si no a un efecto citoprotector.

## RESULTADOS



**Figura 17: El CS reduce la muerte espontánea de las células SH-SY5Y.** Las células fueron incubadas durante 48 horas con concentraciones crecientes de CS (60-100 μM), y después se midió la liberación de LDH al medio extracelular como indicador de muerte celular. Los datos corresponden a la media más el error estándar de triplicados de cuatro pases de células diferentes. \*P<0.05 respecto a las células basales sin tratar.



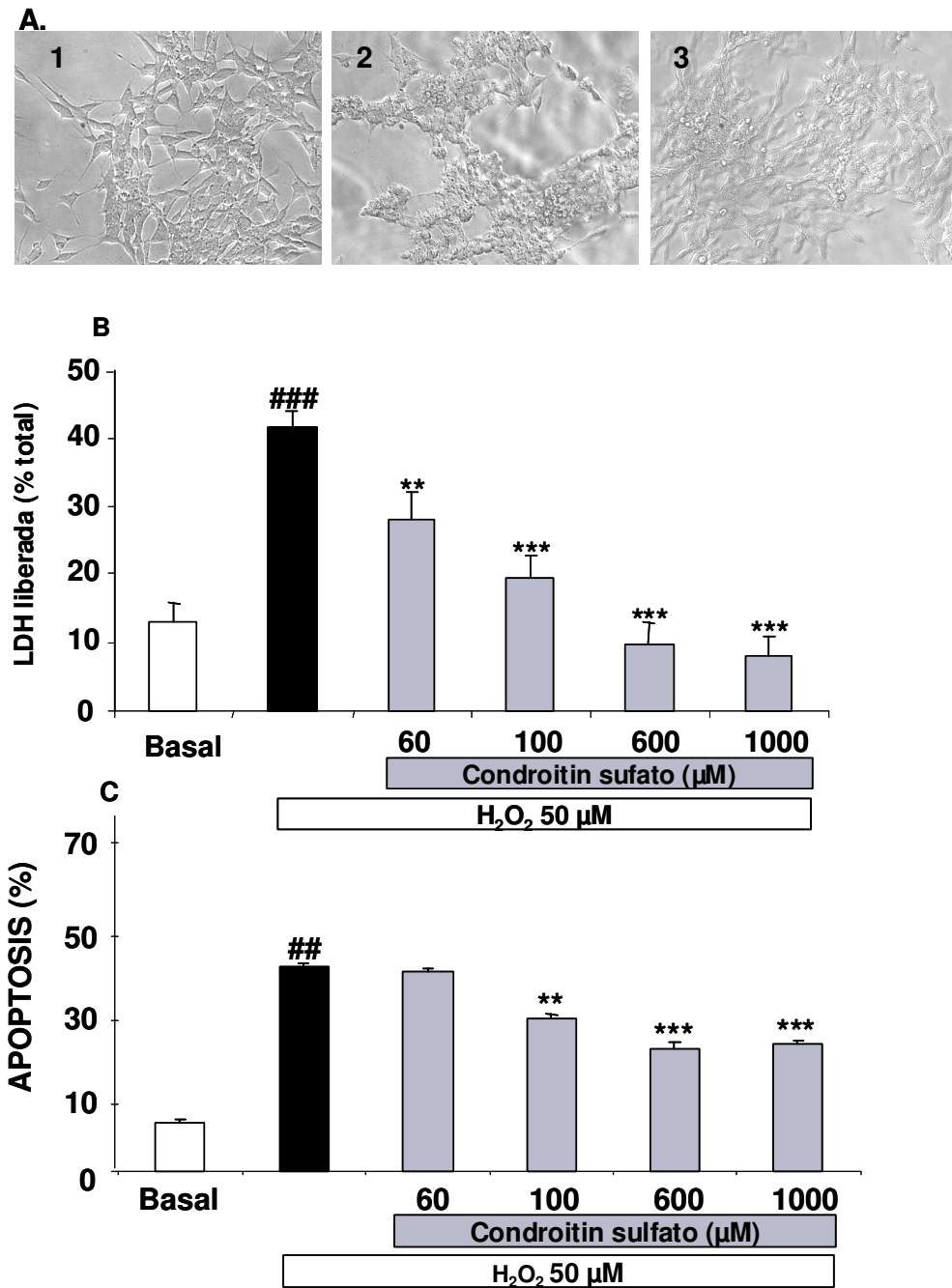
**Figura 18: EL CS no modifica la proliferación celular.** A. Análisis del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, tras 48 horas en ausencia o presencia de CS 10 o 60μ. Los datos corresponden a la media más el error estándar de triplicados de cuatro cultivos. B. Resultados de un experimento similar al A., pero midiendo la reducción de MTT como indicador de proliferación celular. Los datos corresponden a la media más el error estándar de triplicados de cuatro experimentos.

### EL CS PROTEGE FRENTE A LA TOXICIDAD INDUCIDA POR $H_2O_2$

El primer modelo de estrés oxidativo consistió en tratar las células durante 24 horas con  $H_2O_2$  a la concentración de 50  $\mu M$ . Tal como puede observarse en las microfotografías de la parte superior de la figura 18, las células control que se mantuvieron durante 24 horas solamente en DMEM muestran una membrana plasmática íntegra, nítida y birrefringente (Fig. 19A). Sin embargo, las células expuestas a  $H_2O_2$  muestran un aspecto granular, sus membranas celulares son irregulares y han perdido su birrefringencia (Fig. 19B). Curiosamente, cuando las células se trataron 24 horas antes y durante el estímulo tóxico con CS, éstas adoptaron un aspecto más parecido a las células control (Fig. 19C), indicando que había habido protección celular.

El tratamiento de las células SH-SY5Y durante 24 horas con 50  $\mu M$  de  $H_2O_2$  incrementaron su muerte basal, medida como el porcentaje de LDH liberada al medio extracelular, del 12 al 45%. Bajo estas condiciones experimentales, el pretratamiento de las células con concentraciones crecientes de CS, 24 horas antes y durante el estímulo tóxico, produjo una protección concentración dependiente. Las concentraciones de 0.6 y 1 mM de CS ofrecieron una protección total (Fig. 19 B); de hecho, la liberación de LDH a estas concentraciones fue incluso menor que la basal, dato que apoya el efecto citoprotector del CS frente a la muerte celular espontánea resultante de la edad del cultivo (vea Fig. 17).

En otra serie de experimentos, paralelos a los anteriores, se cuantificó el número de células en apoptosis por citometría de flujo en células teñidas con yoduro de propidio. Los resultados se muestran en la figura 18C, tal como puede observarse, el CS ofreció un efecto antiapoptótico significativo a concentraciones comprendidas entre 100 y 1000  $\mu M$ , pero dicho efecto no llegó a los niveles de la basal tal como se había observado en los experimentos donde se evaluó la muerte mediante la liberación de LDH. Estos resultados sugieren que el CS puede resultar eficaz en prevenir tanto la muerte necrótica como apoptótica inducida por  $H_2O_2$ .



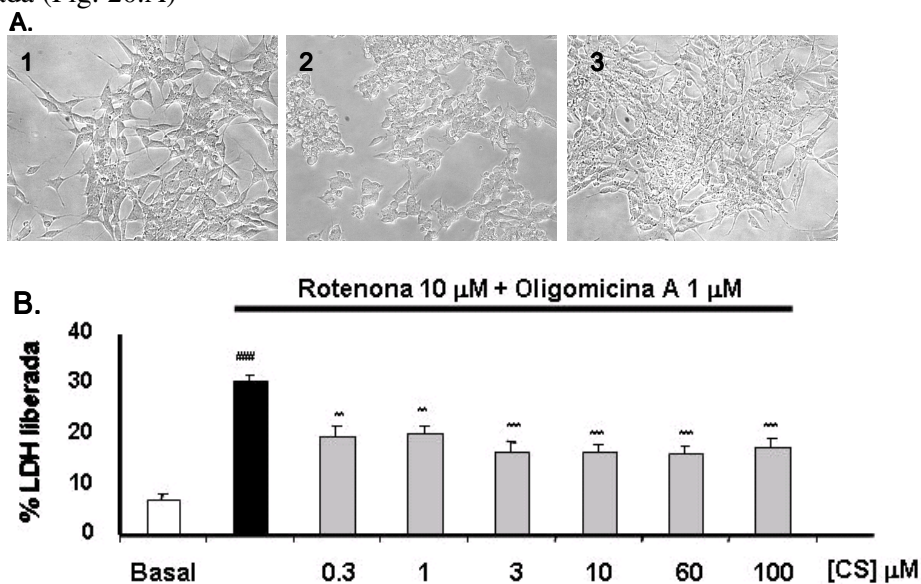
**Figura 19: : El CS provoca una protección dosis-dependiente en las células SH-SY5Y frente a la toxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (A) Las microfotografías muestran imágenes tomadas en contraste de fases a 20X. 1. Basales 2. Células tratadas 24 horas con 50 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 3. Células pretratadas con CS 600 μM durante 24 horas y 24 horas más con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μM en presencia de CS. (B) Efecto del daño producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> medido como la liberación de LDH al medio en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de CS. Las células fueron pretratadas 24 horas antes y durante el estímulo tóxico. (C) Efectos antiapoptóticos de concentraciones crecientes de CS, medido en un citómetro de flujo en células teñidas con yoduro de propidio. Los datos corresponden a la media más el error estándar de cuatro a seis experimentos diferentes. \*\*,p<0.01 y \*\*\*,p<0.001 respecto a la toxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ausencia de CS (columna negra), y ###,p<0.001 con respecto a las condiciones basales.

## RESULTADOS

### EL CONDROITIN SULFATO PROTEGE FRENTE A LA TOXICIDAD INDUCIDA POR LA COMBINACIÓN DE ROTENONA Y OLIGOMICINA-A

El otro modelo de estrés oxidativo utilizado en este estudio consiste en el bloqueo de los complejos I y V mitocondriales empleando la combinación de 10  $\mu\text{M}$  de rotenona más 1  $\mu\text{M}$  de oligomicina-A (Rot/oligo), respectivamente. Como resultado de la interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial, la célula se ve incapaz de seguir produciendo ATP, y los radicales libres se generan excediendo la capacidad de la célula para neutralizarlos, y como resultado, la muerte celular.

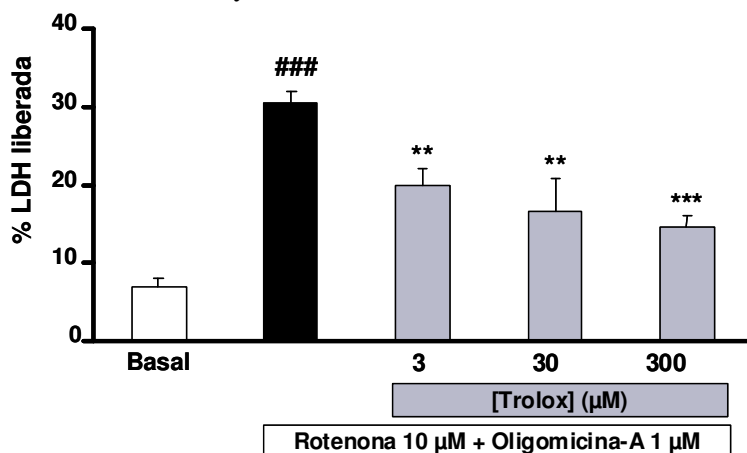
La exposición de las células SH-SY5Y durante 24 horas a Rot/oligo incrementó la muerte celular respecto a la basal de un 8% a un 35%. En la figura 20.B(2), se puede observar el daño celular, sus bordes se tornan irregulares; véase también la diferencia respecto a las basales, figura 20.B(1), y las tratadas con CS 60  $\mu\text{M}$  más Rot/oligo, figura 20.B(3). En presencia de CS, las células recuperan su densidad inicial, y muestran una apariencia más saludable. Esto se observa mejor en el histograma de la figura 20.B. El pretratamiento de las células con CS 24 horas antes y durante el estímulo tóxico, provoca una protección significativa ya a 0.3  $\mu\text{M}$ . La protección máxima (48%) se produjo a 3  $\mu\text{M}$ ; esta protección se mantuvo hasta los 100  $\mu\text{M}$ , la máxima concentración evaluada (Fig. 20.A)



**Figura 20. El CS protege las células SH-SY5Y frente a la muerte inducida por Rot/oligo.** (A) Las microfotografías muestran imágenes de contraste de fase a 20 X de 1. Células control, 2. Células tratadas 24 horas con 10  $\mu\text{M}$  de rotenona más 1  $\mu\text{M}$  de oligomicina-A (Rot/oligo), y 3. Células pre-tratadas 24 horas con 60  $\mu\text{M}$  de CS previas al tratamiento de otras 24 horas con Rot/oligo en presencia de CS. (B) Datos promedios de liberación de LDH al medio mediados por la Rot/oligo en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de CS (0.3-100  $\mu\text{M}$ ). Los datos corresponden a la media más el error estándar de cinco experimentos por triplicado. ###,  $p < 0.001$  respecto a la basal; \*\*,  $p < 0.01$  y \*\*\*,  $p < 0.001$  respecto al grupo Rot/oligo.

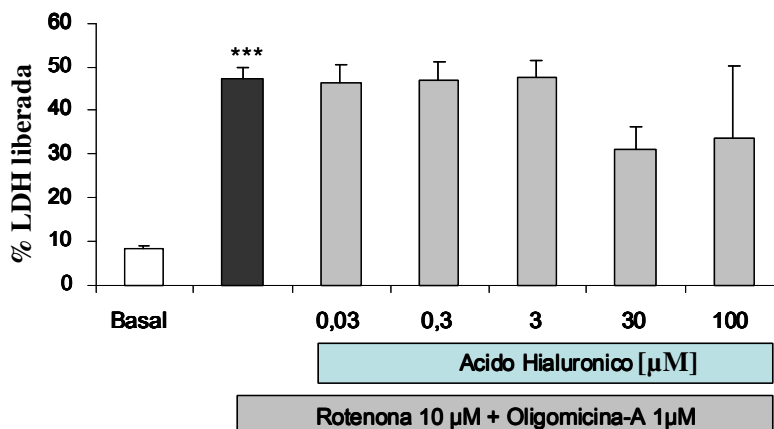
## RESULTADOS

Con fines comparativos, realizamos experimentos paralelos con el antioxidante trolox (la parte activa de la vitamina E) en este mismo modelo de estrés oxidativo. Los resultados se muestran en la figura 21; el Trolox redujo la muerte inducida por Rot/oligo, aunque las concentraciones que se necesitaron para obtener dicha protección resultaron ser 10 veces mayores a las de CS.



**Figura 21:** Daño celular (liberación de LDH) causado por Rot/oligo en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de trolox. Los datos corresponden a la media más el error estándar de cinco experimentos. \*\*,  $p < 0.01$  y \*\*\*,  $p < 0.001$  respecto a Rot/oligo en ausencia de Trolox (columna negra), y ###,  $p < 0.001$  respecto a la basal (columna blanca).

Para comprobar si en este modelo de generación de radicales libres podría verse protección por algún compuesto análogo al CS, utilizamos el ácido hialurónico (HA), que es un proteoglicano de la familia del CS. Ante la muerte provocada por Rot/oligo, no se vio que el HA protegiera a ninguna de las concentraciones utilizadas aunque a la dosis de 30 µM parece haber una tendencia (Fig. 22).



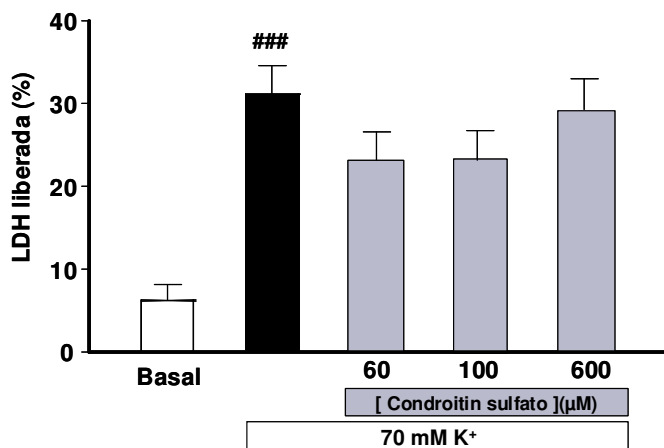
**Figura 22:** El ácido hialurónico protegió frente a la lesión inducida por Rot/oligo. Las células se pre-incubaron con el HA 24 horas antes y durante la aplicación del estímulo tóxico. En el gráfico se observa que no se produjo protección significativa frente a muerte celular producida por Rot/oligo a ninguna concentración de HA. Los datos corresponden a la media más el error estándar, de tres a cinco experimentos por triplicado; \*\*\*,  $p < 0.001$  respecto a las condiciones basales.

## RESULTADOS

### EFFECTO DEL CS SOBRE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR SOBRECARGA DE CALCIO

Durante la isquemia, debido al fallo de las bombas situadas en la membrana celular como consecuencia del fallo energético, las neuronas sufren una despolarización anóxica que conlleva a una sobrecarga de calcio y, ésta pone en marcha la activación de un conjunto de procesos que provocan la muerte celular (vea introducción para mayor detalle). Para simular en nuestros cultivos celulares una situación de sobrecarga de calcio, tratamos las células SH-SY5Y durante 24 horas con una concentración despolarizante de potasio (70 mM).

El incremento de calcio intracelular ocasionado por la exposición de las células a 70 mM de potasio incrementó la muerte celular de un 5 % (basal) a un 30% (tóxico). En estas condiciones experimentales, el CS no ofreció protección significativa (Fig. 23) a ninguna de las concentraciones evaluadas (60-1000  $\mu$ M). Por tanto, el CS mostró eficacia protectora frente a estímulos tóxicos de estrés oxidativo pero no de sobrecarga de calcio.



**Figura 23:** *El CS no protegió frente la toxicidad inducida por sobrecarga de calcio.* Las células fueron pretratadas 24 horas antes y durante la exposición del estímulo. El gráfico muestra lesión, medida como liberación de LDH, provocados por la incubación durante 24 horas de las células con 70 mM de potasio en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de CS (60-600  $\mu$ M). Los datos corresponden a la media más el error estándar de seis experimentos diferentes; ###,  $p < 0.001$  respecto a condiciones basales.

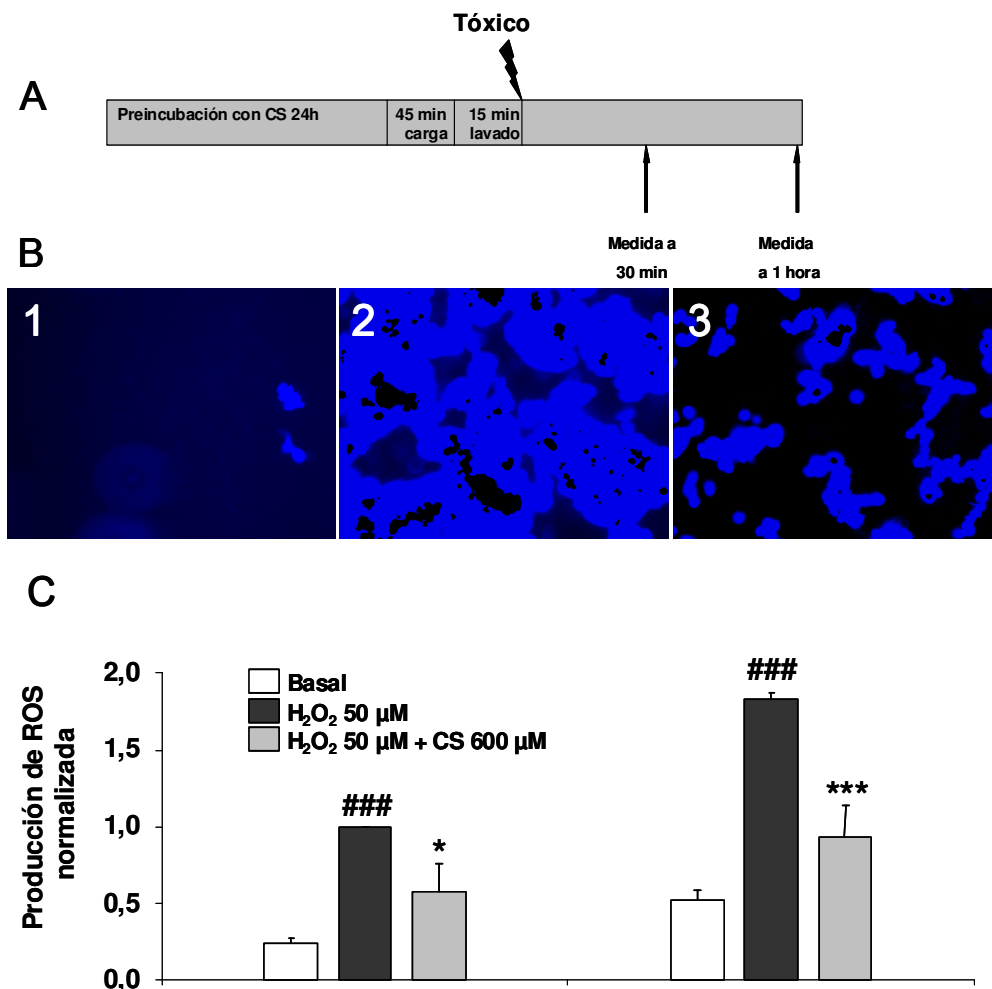


### EL CS REDUCE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Tal como se ha mostrado en los experimentos anteriores, el CS mostró eficacia neuroprotectora en diferentes modelos de estrés oxidativo. Por ello, a continuación se evaluó si este compuesto podría modificar la producción de ROS inducida por  $H_2O_2$  o Rot/oligo. Con este propósito utilizamos la sonda fluorescente DFCDA, que incrementa su fluorescencia cuando se generan radicales libres dentro de la célula.

La microfotografía mostrada en la figura 24B-1 muestra la fluorescencia basal de las células SH-SY5Y teñidas con la sonda fluorescente DFCDA. Esta fluorescencia incrementó en las células tratadas con  $H_2O_2$  50  $\mu$ M (Fig. 24B-2) y, se redujo cuando las células se pretrataron con CS antes de la adición de  $H_2O_2$ . (Fig. 24B-3). La figura 24C resume los datos obtenidos en varios cultivos celulares: el  $H_2O_2$  ocasionó un aumento significativo de la producción de ROS medidos a los 30 y 60 minutos tras la adición de  $H_2O_2$ . Cuando las células se pretrataron 24 horas con una concentración neuroprotectora de CS, el incremento de fluorescencia fue significativamente menor que cuando se adicionó  $H_2O_2$ .

Por tanto, estos resultados sugieren que la protección celular ejercida por el CS, frente la lesión inducida por  $H_2O_2$ , está relacionada con una menor producción de radicales de oxígeno.

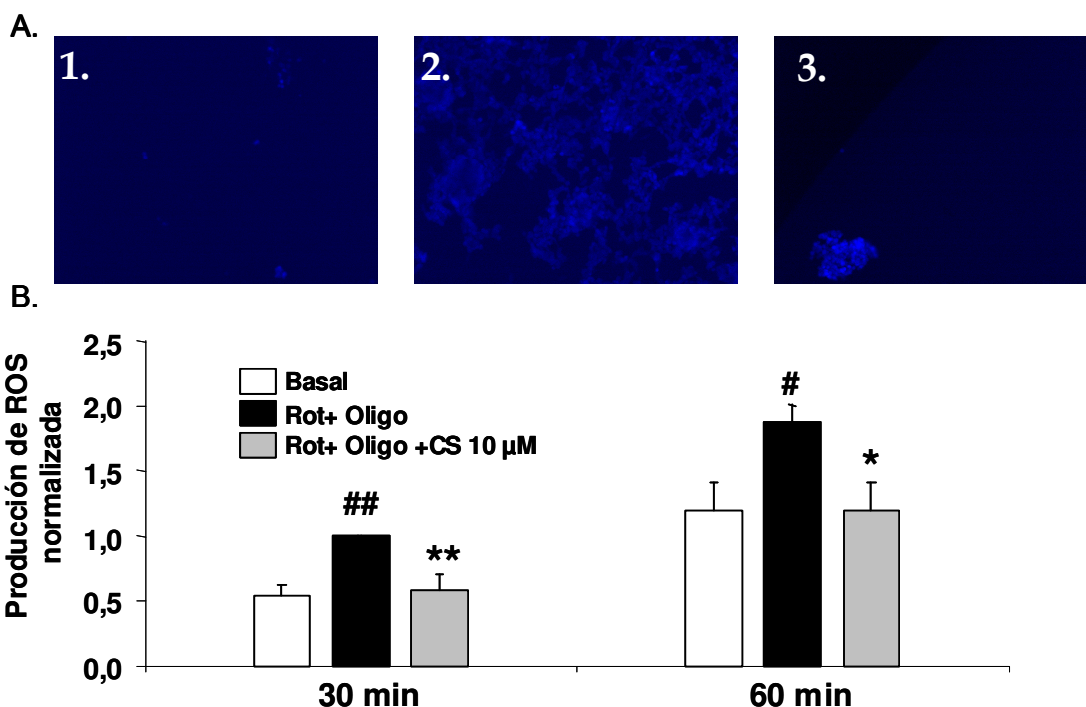


**Figura 24: El CS reduce la producción de ROS provocada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** En la parte superior de la figura (A), se muestra el protocolo empleado para medir radicales libres con la sonda fluorescente DFCDA. (B) Imágenes de fluorescencia de DFCDA tomadas a 20X de las células SH-SY5Y en condiciones basales (1), tras la exposición a 50 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (2), o tras la exposición de las células a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μM previa incubación con CS durante 24 horas (3). La figura (C) representa los resultados promedios de generación de ROS, provocada por la incubación de 30 o 60 minutos con el tóxico H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bajo condiciones basales, y tras añadir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en ausencia o presencia de CS. Los valores representan la media más el error estándar de seis experimentos. \*, p<0.05; \*\*\*, p<0.001, respecto al generador de ROS, y ###, p<0.001 respecto a las condiciones basales.

Cuando los ROS fueron generados por interrupción de la cadena respiratoria utilizando Rot/oligo se observó un patrón similar. La microfotografía de la figura 25A (1), muestra la fluorescencia basal de DFCDA en células no tratadas con Rot/oligo. Sin embargo, cuando las células se expusieron a Rot/oligo, el número de células fluorescentes se vio incrementado (Fig. 25A 2); en células pretratadas con 10 μM de CS durante 24 horas, el número de células fluorescentes se redujo tras 30 minutos de exposición a Rot/oligo (Fig. 25A 3). La figura 25B recoge los datos promedios de

## RESULTADOS

fluorescencia de DFCDA como medida de ROS. La combinación de Rot/oligo provocó un incremento significativo de producción de ROS tanto a 30 como a 60 minutos; el pretratamiento de las células con CS durante 24 horas antes de la exposición al tóxico previno el incremento de ROS (Fig. 25B). Estos resultados muestran que el pretratamiento con CS puede reducir la formación de radicales libres inducidos por Rot/oligo.



**Figura 25: El CS reduce la producción de radicales libres provocada por Rot/oligo.** En la parte superior de la figura se observan microfotografías tomadas a 20X de células control (A) 1, de células expuestas a Rot/oligo (A) 2, y de células pretratadas 24 horas con CS antes de la aplicación de Rot/oligo (A) 3. El histograma (B) muestra los datos promedio de producción de ROS en condiciones basales, a 30 y a 60 minutos de incubación con Rot/oligo con preincubación de CS 10  $\mu$ M durante 24 horas y sin ella. Los datos corresponden a la media más el error estándar de siete pases de células diferentes. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$  comparado con el tóxico solo. #,  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$  respecto a la basal.

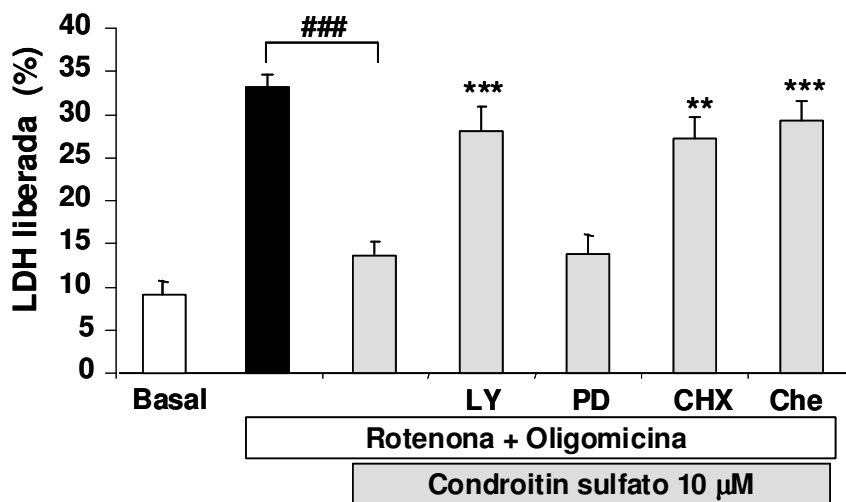
EL EFECTO PROTECTOR DEL CS ES PKC Y PI3K DEPENDIENTE, PERO INDEPENDIENTE DE ERK.

Para analizar la vía de señalización que podría estar implicada en el efecto protector del CS, diseñamos experimentos utilizando inhibidores de la PKC, de PI3K, de ERK 1/2, e inhibidores de la síntesis proteica.

Los efectos protectores del CS frente a la toxicidad inducida con Rot/oligo, se vieron revertidos con el inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida, el inhibidor de PKC queleritrina, y con el inhibidor de la PI3K/Akt LY294002, pero no se vio influido

## RESULTADOS

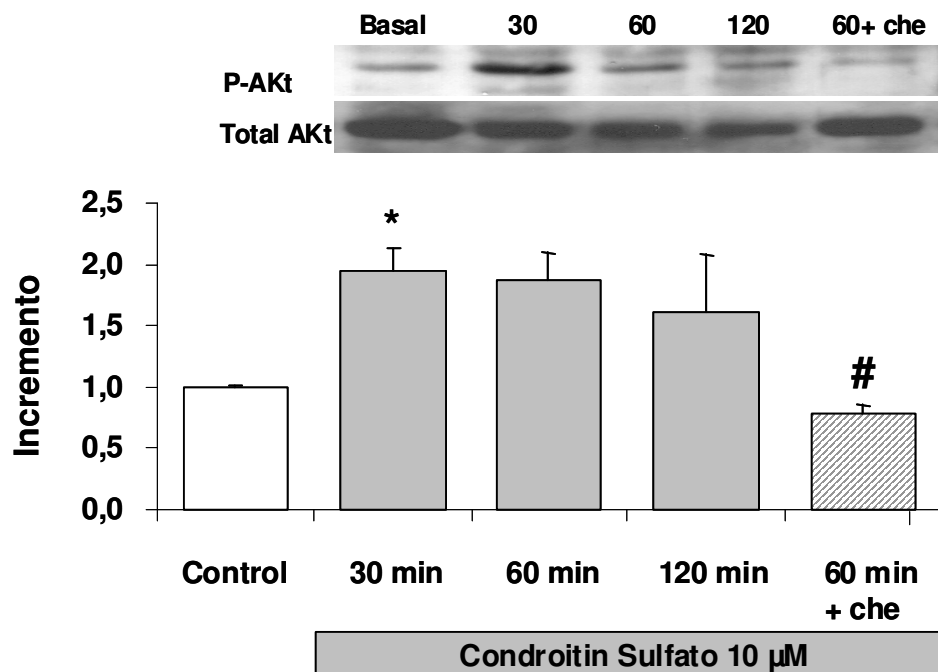
por el PD98059, un inhibidor de la proteína ERK 1/2 (Fig. 26). Estos resultados muestran que la PKC junto con PI3K/Akt y la síntesis de proteínas, pero no la vía ERK 1/2 están implicadas en los efectos protectores del CS.



**Figura 26: Implicación de la vía PI3K/Akt y PKC en la protección mediada por CS.** Los efectos protectores del CS fueron revertidos por el antagonista de la PI3K/Akt LY294002 (10 μM), el bloqueante de la síntesis proteica cicloheximida (1 μM) y el inhibidor de la PKC queleritrina (0.1 μM). El inhibidor de la ERK 1/2 PD98059 (10 μM) no revirtió la protección mediada por CS. Todos los antagonistas fueron co-incubados con el CS 24 horas antes del estímulo tóxico, y estuvieron presentes durante las 24 horas de incubación con Rot/oligo. Los datos corresponden a la media más el error estándar de siete experimentos. ###,  $p < 0.001$  respecto a la toxicidad inducida por Rot/oligo; \*\*,  $p < 0.01$  y \*\*\*,  $p < 0.001$  respecto a la protección mediada por el CS.

Para corroborar si el CS estaba activando Akt, se trataron las células SH-SY5Y con 10 μM de CS durante 30, 60 y 120 minutos, y los lisados celulares se corrieron en un gel SDS-PAGE y fueron analizados por western blot con anticuerpos anti-Akt. El CS causó la máxima fosforilación de Akt a los 30 minutos; la fosforilación de Akt inducida por CS fue inhibida por el antagonista de la PKC, queleritrina. Estos resultados sugieren que la activación de Akt por CS es PKC dependiente (Fig. 27).

## RESULTADOS



**Figura 27: El CS induce la fosforilación de Akt.** En la parte superior de la figura se muestra el western blot de fosfo-Akt y Akt total en células SH-SY5Y tratadas 30, 60 y 120 minutos con CS 10  $\mu$ M, y en células tratadas 60 minutos con CS y el inhibidor de PKC, queleritrina (0.1  $\mu$ M). En la parte inferior se muestra la cuantificación densitométrica de los niveles de fosfo-Akt comparados con Akt total. Los valores corresponden a la media más el error estándar de al menos cinco experimentos. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  comparado con las células control; y ## $p < 0.01$  comparado con las células tratadas con CS.

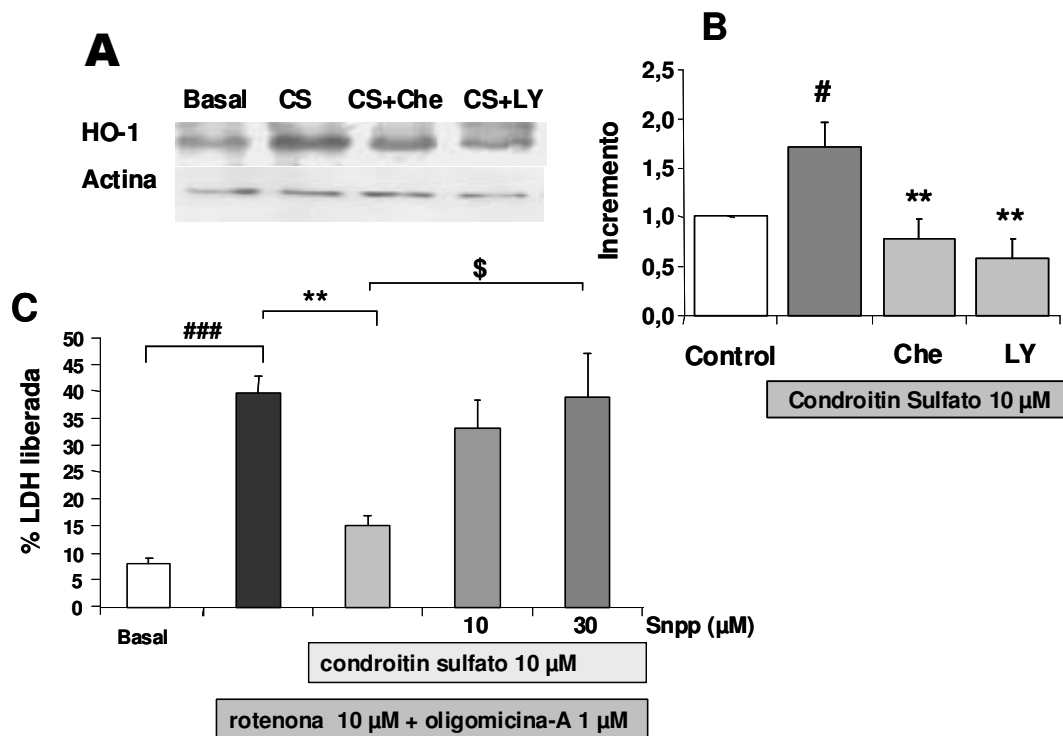
LOS EFECTOS PROTECTORES DEL CS ESTÁN RELACIONADOS CON LA INDUCCIÓN DE HEMOOXIGENASA-1 (HO-1)

Dado que Akt puede inducir la enzima antioxidante HO-1, se evaluó la participación de esta proteína en el efecto protector del CS. Para ello, las células fueron incubadas durante 24 horas en presencia de 10  $\mu$ M de CS, y los lisados celulares se resolvieron en SDS-PAGE y se analizaron por western blot con el anticuerpo anti-HO-1 (Fig. 28). El CS incrementó casi 2 veces la expresión de HO-1 en comparación con las células control. La co-incubación de las células con CS y el inhibidor de la vía PI3K/Akt, el LY294002, redujo la expresión de HO-1 a niveles basales, indicando que la PI3K/Akt estaba implicada en la sobreexpresión de HO-1 inducida por CS. También se observó que la co-incubación de las células con CS y queleritina, también reducía la

## RESULTADOS

expresión de HO-1 a niveles basales (Fig. 28). Por tanto, el CS induce HO-1 por una vía que implica PKC.

Para corroborar que la HO-1 estaba implicada en el efecto protector del CS, utilizamos la protoporfirina de estaño (SnPP), un inhibidor de HO-1 (Marinissen et al., 2006). El CS redujo la muerte celular inducida por Rot/oligo en un 61 % ( $p<0.001$ ); esta protección se perdió cuando las células se co-incubaron con CS más 30  $\mu\text{M}$  de SnPP ( $p<0.01$ ). Estos resultados corroboraban que la HO-1 estaba implicada en efecto protector mediado por el CS.



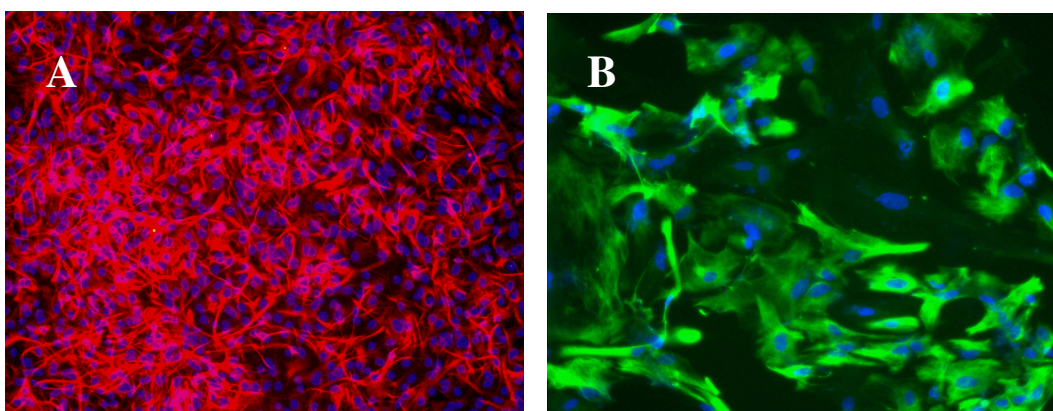
**Figura 28: El CS induce la síntesis de HO-1 y sus efectos protectores están relacionados con esta enzima antioxidante.** (A) Western blot frente HO-1 en células SH-SY5Y incubadas 24 horas con CS en ausencia o presencia de 10  $\mu\text{M}$  de LY294002 ó 0.1  $\mu\text{M}$  de queleritrina. (B) Cuantificación densitométrica de los niveles de la proteína HO-1 utilizando la  $\beta$ -actina para normalizar. Los valores corresponden a la media más el error estándar de seis experimentos. \*\* $p<0.01$  comparado con las basales; y ### $p<0.001$  comparado con las células tratadas con CS. (C) Las células se preincubaron 24 horas con CS solo o en presencia de 30  $\mu\text{M}$  de SnPP, un inhibidor de HO-1. Tras este periodo de preincubación, las células se incubaron 24 horas con Rot/oligo. Los valores corresponden a la media más el error estándar de cuatro experimentos diferentes. ###  $p<0.001$  comparado con la basal; \*\* $p<0.01$  comparado con Rot/oligo; y \$ $p<0.05$  comparado con células en presencia o ausencia de SnPP.

## RESULTADOS

### 3.2. EFECTO DEL CS EN ASTROCITOS ACTIVADOS POR LPS

#### CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS DE ASTROCITOS DE RATA NEONATA

Antes de abordar el estudio del efecto del CS en astrocitos activados por LPS se puso a punto y se caracterizó el cultivo de astrocitos de rata neonata. Tras el subcultivo, (vea sección de Materiales y Métodos) las células se tiñeron con GFAP y Hoechst (Fig. 29), a continuación se realizó un conteo manual de los núcleos Hoechst positivos coincidentes con GFAP positivos. La pureza de los cultivos fue de, aproximadamente, un 95%.

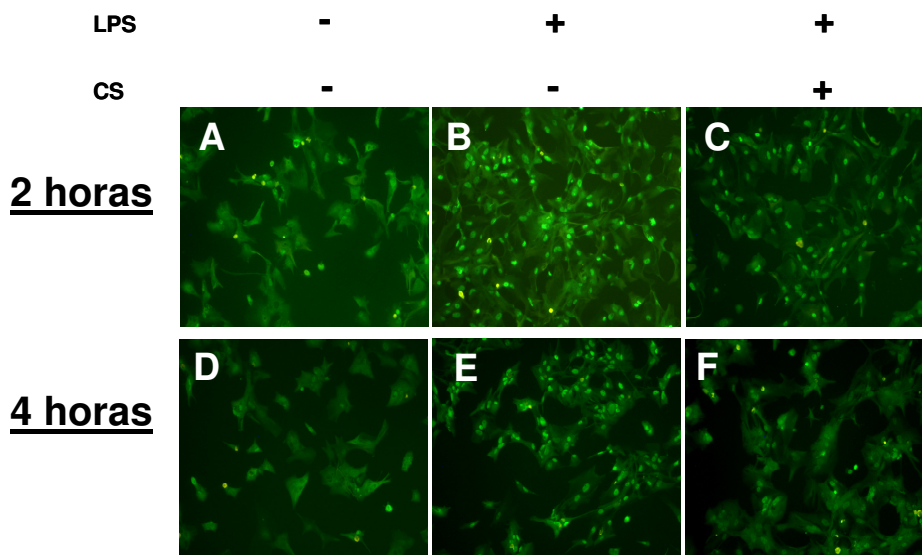


**Figura 29:** Astrocitos de embriones de rata pasados 7 días del subcultivo, teñidos con GFAP y Hoechst. Los astrocitos mostraron un 95% de pureza. A. Microfotografía de un cultivo tomada en un microscopio de fluorescencia a 10 X, con GFAP en rojo y Hoechst en azul. B. Microfotografía de un cultivo tomada a 20 X, con GFAP en verde y Hoechst en azul.

#### EL CS INHIBE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA NFκB PROVOCADA POR LPS

Para determinar si el CS prevenía la activación de NFκB inducida por LPS se expusieron los astrocitos durante 2 y 4 horas a LPS (10 μg/ml) en ausencia o presencia de CS 10 μM. Las inmunocitoquímicas frente la fracción nuclear de NFκB, la subunidad p65, muestran que el LPS induce la traslocación de p65 al núcleo, hecho que se objetiva al verse una fluorescencia más concentrada en el núcleo celular (Fig. 30B y E). En las células control, no expuestas a LPS, la fluorescencia se encontró distribuida de forma difusa por el citoplasma (Fig. 30A y D). Al co-incubar las células con CS y LPS, la fluorescencia volvió a encontrarse difusa en el citoplasma, sugiriendo que el CS previene la traslocación de NFκB al núcleo, y por tanto, su activación. (Fig. 30C y F).

## RESULTADOS



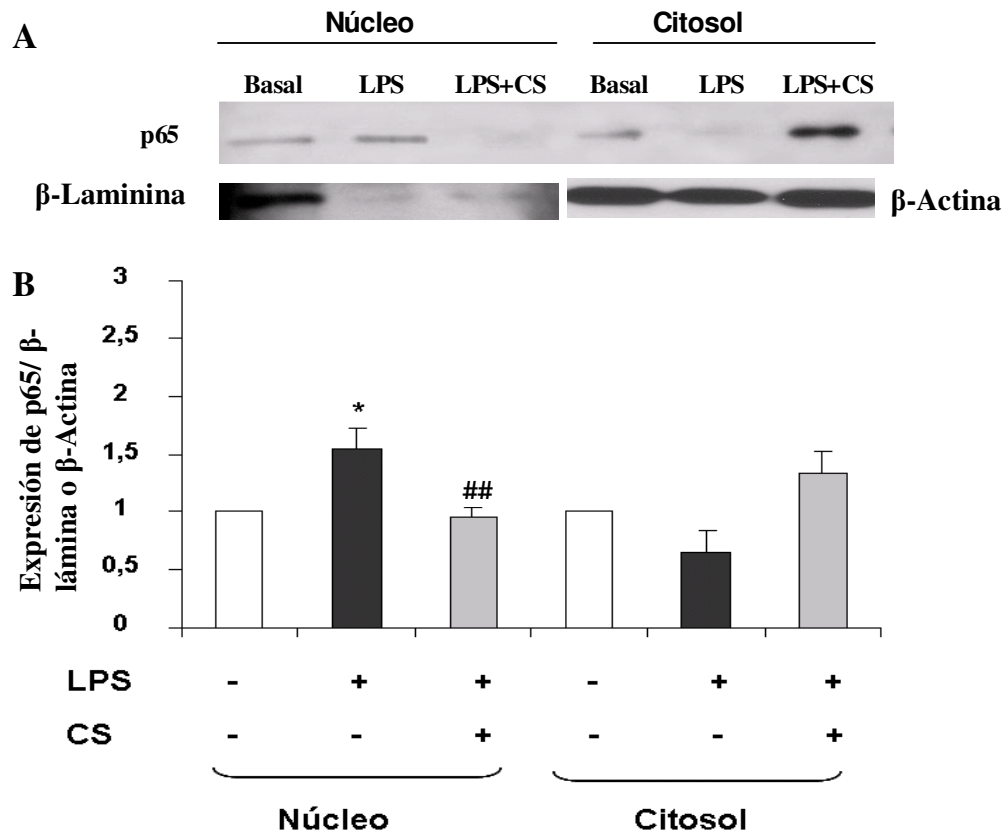
**Figura 30: El condroitin sulfato previene la traslocación de p65 al núcleo tras 2 y 4 horas de exposición a LPS.** Inmunocitoquímicas frente a p65 en cultivos de células SH-SY5Y. **A y D.** Células control que muestran una tinción difusa en el citosol tanto tras las 2 horas (A) como tras las 4 horas (D) de exposición a LPS. **B y E.** La aplicación de LPS provoca un incremento de fluorescencia en el núcleo, mostrando la activación de la vía NFκB por translocación de p65 al núcleo tras un estímulo de LPS de dos horas (B), y de 4 horas (E). En **C y F** se observa como la co-aplicación de CS 10 μM y LPS revierte el incremento de fluorescencia en el núcleo, observándose un marcaje difuso por el citosol, similar al de las células basales a las 2 horas (C) y a las 4 horas (F).

Para poder cuantificar la traslocación de p65 en las condiciones experimentales descritas anteriormente, se trataron astrocitos con DMEM solo (basal), o con LPS solo o en presencia de CS durante 4 horas. A continuación se obtuvieron extractos nucleares y citosólicos y se determinó p65 por western blot.

Los resultados mostraron que al activar las células con LPS, se activó la vía NFκB ya que p65 incrementó en la fracción nuclear y prácticamente desapareció en la fracción citosólica. En las células en las que se co-incubó LPS y CS, se observó que apenas había expresión de p65 en fracción nuclear pero ésta se mantenía en la fracción citosólica. Por tanto, la señal de activación de la vía NFκB por LPS, se revirtió en presencia de CS 10 μM (Fig. 31A), tal como se había observado en las inmunocitoquímicas.



## RESULTADOS



**Figura 31: Activación de la vía NFκB en astrocitos activados por LPS medida como la cantidad de proteína p65 presente en los extractos nucleares y citosólicos.** **A.** Western blot de p65 en extractos nucleares y citosólicos obtenido de astrocitos mantenidos en condiciones basales o tratados con LPS (10 µg/ml) en ausencia o presencia de CS (10 µM) durante 4 horas. **B.** Promedios de las densidades ópticas de las bandas normalizadas respecto a actina. Se observa como al tratar las células con LPS, incrementa la cantidad de p65 presente en núcleo, y como, la presencia de 10 µM de CS revierte este aumento. En el citosol se observa el efecto contrario; la presencia de LPS vacía el citosol de p65, y la presencia conjunta del LPS y CS, vuelve a reponer los niveles. Los datos corresponden a la media más el error estándar de tres a siete experimentos diferentes. \*  $p < 0.05$  respecto a la basal; ##  $p < 0.01$  respecto a LPS solo.

### EL CS REDUCE LA EXPRESIÓN DE TNF-ALFA INDUCIDA POR LPS

Para profundizar en el mecanismo antiinflamatorio del CS, nos propusimos estudiar su efecto sobre la expresión de quimioquinas pro-inflamatorias relacionadas con la activación glial. Para ello realizamos RT-PCRs tras 2 y 4 horas de aplicación de LPS en ausencia o presencia de CS 10 µM para cuantificar la cantidad de ARN mensajero de dichas citoquinas.

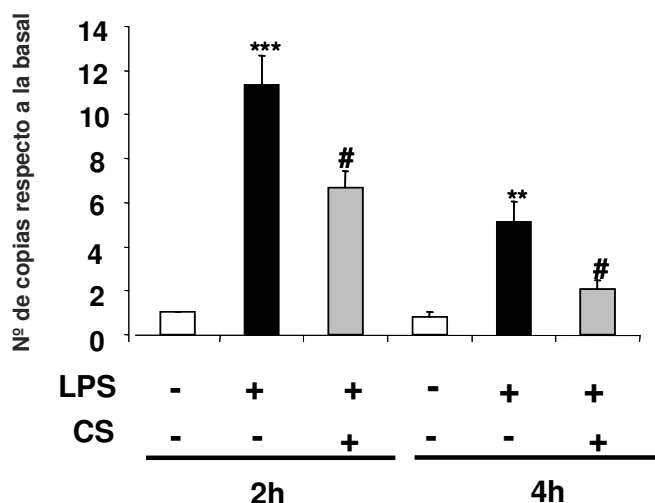
El TNF-alfa es una citoquina que tiene un papel dual en la vía NFκB. Por un lado es capaz de activarla cuando se une a su receptor extracelular, y por otro lado, es

## RESULTADOS

uno de los genes diana de esta vía, de modo que, cuando esta vía está activada se expresa más TNF-alfa, creando una retroalimentación positiva.

Por este motivo estimamos que sería interesante investigar de qué forma podría estar afectando la presencia de CS a la expresión de TNF-alfa.

En la figura 32 se observa como el LPS fue capaz de aumentar de forma significativa el mRNA de TNF-alfa, tanto a las 2 como a las 4 horas de exposición a LPS, aunque dicho incremento fue mayor a las 2 horas. La presencia del CS junto al LPS, redujo a casi la mitad el aumento de expresión de esta citoquina, tanto a las 2 como a las 4 horas de exposición a LPS.

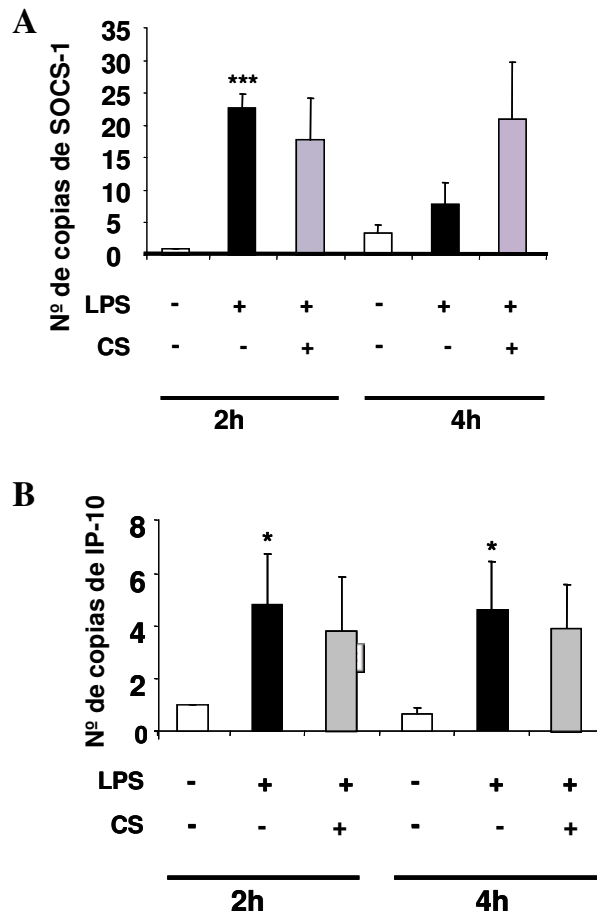


**Figura 32: RT-PCR de TNF-alfa tras 2 y 4 horas de exposición a LPS, en ausencia o presencia de CS 10  $\mu$ M.** A las 2 horas, la expresión de TNF-alfa se multiplicó por 12 en presencia de LPS, y este aumento se vio reducido a la mitad en presencia de CS. A las 4 horas de exposición, el efecto fue similar, solo que la exposición a LPS solo aumentó unas 6 veces la expresión basal, y esta vez, también, el CS la redujo a la mitad. Los datos corresponden a la media más el error estándar de 5 experimentos. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  respecto a la expresión basal. #,  $p < 0.05$  respecto al grupo LPS.

Dado que TNF-alfa puede activarse por la vía NF $\kappa$ B, pero también por la vía JAK/STAT, decidimos evaluar si la reducción de TNF-alfa ocasionada por CS podría también relacionarse con esta segunda vía de señalización. Para ello, determinamos por RT-PCR la expresión de las citoquinas SOCS-1 e IP-10 que son características de la vía JAK/STAT. Los resultados se muestran en la figura 33. La incubación de los astrocitos con LPS incrementó los niveles de SOCS-1 e IP-10, tanto a las 2 como a las 4 horas de exposición. El CS no modificó los niveles de SOCS-1 ni de IP-10 inducidos por LPS.

## RESULTADOS

Estos resultados sugieren que el CS no está interaccionando con la vía JAK/STAT y, que la reducción de TNF-alfa se debe fundamentalmente a su interacción con la vía del NFκB.



**Figura 33: RT-PCR de SOCS-1 e IP-10 tras 2 y 4 horas de exposición a LPS en ausencia o presencia de CS 10 μM.** (A) Tras 2 horas de exposición a LPS, la expresión de SOCS-1 aumentó de forma significativa, y este aumento no se vio alterado por la presencia de CS. A las 4 horas de exposición a LPS, el efecto fue parecido, solo que la exposición a LPS solo aumentó en menor medida la expresión basal. (B) A las 2 y 4 horas de exposición el LPS aumentó la expresión de IP-10, el CS no fue capaz de revertir a ningún tiempo. Los datos corresponden a la media más el error estándar de 5 experimentos. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  respecto a la expresión basal.

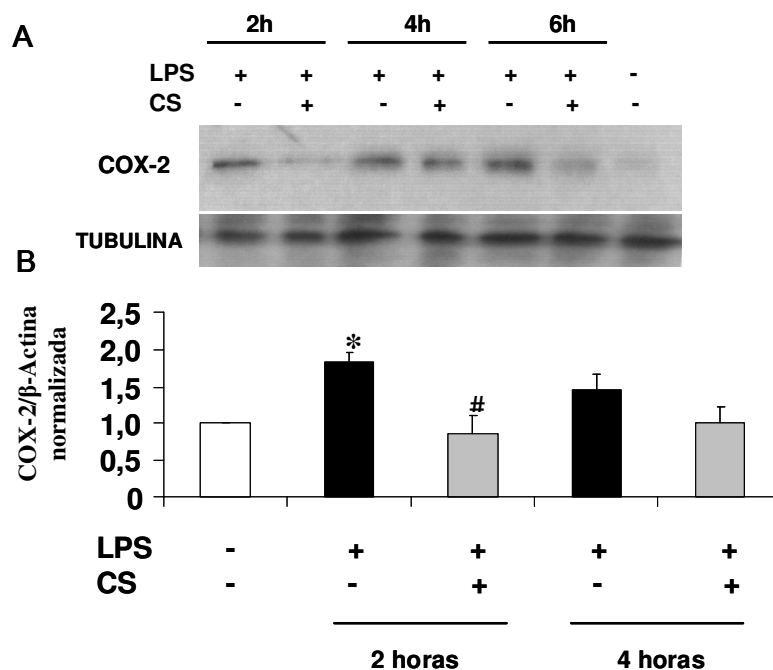
### EL CS REDUCE LA EXPRESIÓN DE COX-2 E INOS, GENES DIANA DE LA VÍA NFκB ACTIVADOS POR LPS

Para confirmar que la inhibición de la vía NFκB ocasionada por el CS tenía consecuencias funcionales, nos planteamos investigar si algunos genes diana de esta vía, como la COX-2 y la iNOS se veían afectados. La COX-2, una enzima inducible capaz

## RESULTADOS

de la producción de prostaglandinas, y la iNOS, es otra enzima inducible, responsable de la producción de óxido nítrico.

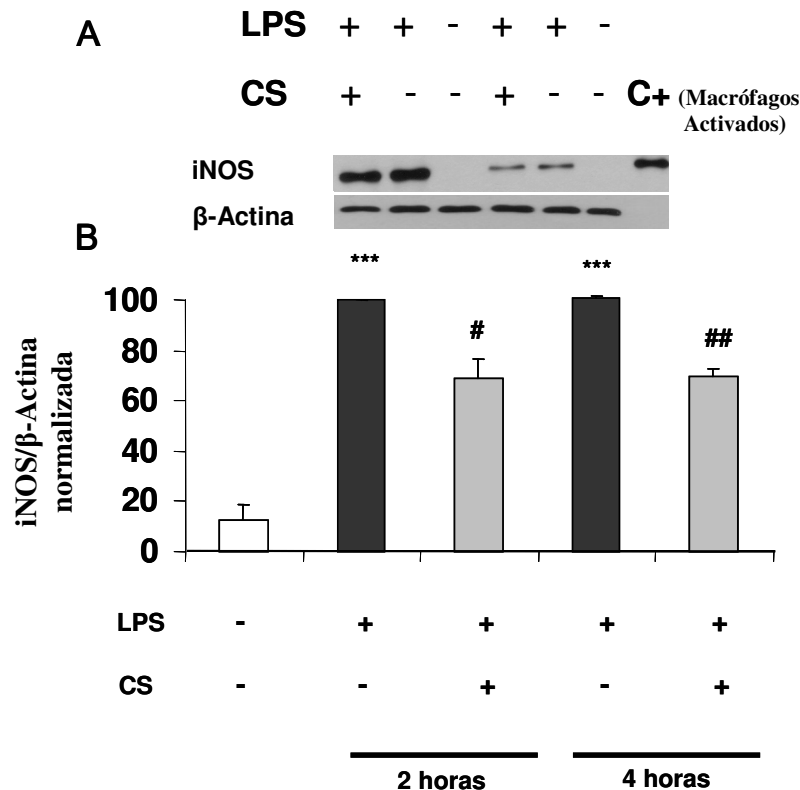
En la figura 34 se muestra el curso temporal de expresión de COX-2 tras 2, 4 y 6 horas de exposición a LPS. Cuando se cuantificó la expresión de COX-2, se observó que el LPS indujo de forma significativa la expresión de COX-2 tras 2h de exposición, y el CS redujo su expresión a niveles basales. Tras 4 h de exposición a LPS, el incremento de COX-2 no llegó a ser estadísticamente significativo; en este caso los niveles de expresión en las células tratadas con LPS y CS también mostraron niveles similares a la basal. Estos resultados apoyan que el CS estaría inhibiendo la vía NFκB.



**Figura 34: El CS inhibe la expresión de COX-2 en astrocitos activados por LPS.** (A) Western blots de COX-2 en células expuestas a LPS durante 2, 4 y 6 horas en ausencia o presencia de CS 10 μM. (B) Datos promedio de la cuantificación de los western blot de COX-2 tras 2 y 4 horas de exposición a LPS en ausencia o presencia de CS (10 μM). Los datos corresponden a la media más error estándar de al menos 3 experimentos diferentes. \*p<0.05 respecto a la basal; #p<0.05 respecto al grupo LPS.

## RESULTADOS

Cuando se valoró la expresión de iNOS en condiciones similares a las de COX-2, se obtuvieron resultados parecidos. El estímulo pro-inflamatorio indujo una expresión significativa de esta enzima inducible tanto tras 2 horas como tras 4 horas de exposición a LPS; el CS redujo de forma significativa la expresión de iNOS provocada por LPS, a los dos tiempos evaluados (Fig. 35).

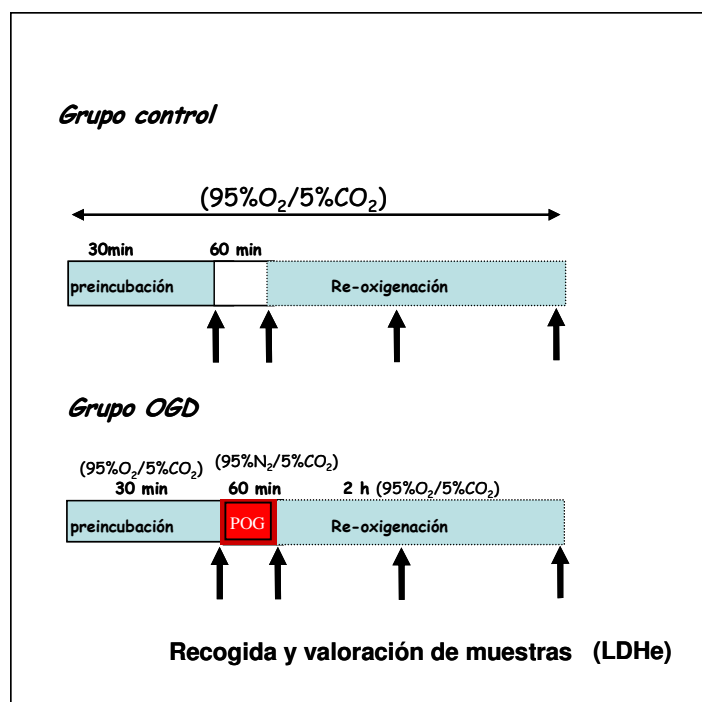


**Figura 35: El CS reduce la expresión de iNOS inducida por LPS.** A. Western blot de la expresión de iNOS en astrogliia. B. Datos promedio de la cuantificación de las bandas. A dos y cuatro horas la expresión de iNOS se multiplicó de forma drástica, y la co-incubación con CS fue capaz de revertir parte de esta sobreexpresión de forma significativa. \*\*\*,  $p < 0.001$  respecto a la basal; #,  $p < 0.05$  y ##,  $p < 0.01$  respecto a la aplicación del LPS solo. Los datos corresponden a la media más el error estándar de cuatro experimentos.

## RESULTADOS

### 3.3. EFECTO DEL CS EN RODAJAS DE HIPOCAMPO SOMETIDAS A PRIVACIÓN DE OXIGENO Y GLUCOSA

Dado que el CS había mostrado efecto neuroprotector en las células SH-SY5Y en distintos modelos de estrés oxidativo, nos planteamos estudiar si podría conservar sus propiedades neuroprotectoras en un modelo más complejo. Para ello, empleamos rodajas de hipocampo de rata sometidas a un periodo de privación de oxígeno y glucosa de 1 hora seguido de un periodo de re-oxigenación de 2 horas (Fig. 36); durante el periodo de re-oxigenación se generan gran cantidad de radicales libres que contribuyen a la muerte neuronal.

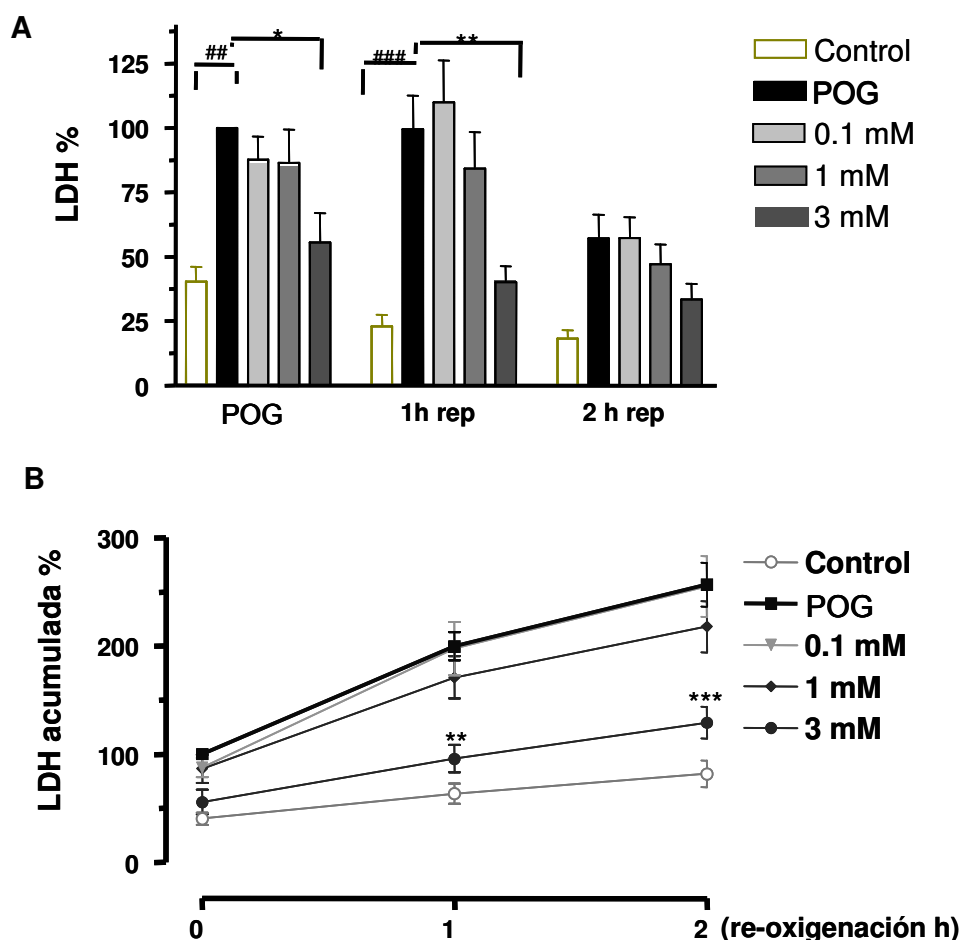


**Figura 36:** Esquema del protocolo empleado para evaluar el efecto neuroprotector del CS en rodajas de hipocampo control (Grupo control) o sometidas al estímulo tóxico de privación de oxígeno y glucosa seguido de re-oxigenación (Grupo POG).

La LDH liberada al medio extracelular, como indicador de muerte celular, en las distintas situaciones experimentales se representa en la figura 37A. La liberación basal, expresada como porcentaje de la liberación de LDH en el grupo POG control tras la hora de isquemia fue de un 28%. El CS redujo en forma concentración-dependiente la lesión celular tras la hora de POG aunque, durante la re-oxigenación,

## RESULTADOS

la reducción de la lesión fue más aparente. La mayor protección se obtuvo a la concentración de 3 mM (74.9% de protección) mientras que a la concentración de 1 mM la protección fue del 31.1%, valores tomados tras la segunda hora de reperfusión. Otra forma de representar estos resultados es calculando la liberación de LDH acumulada en el tiempo, tal como se representa en la figura 37B. Como puede observarse, sólo la concentración de 3 mM de CS produjo un descenso significativo de la lesión celular inducida por la privación de oxígeno y glucosa seguida de re-oxigenación.

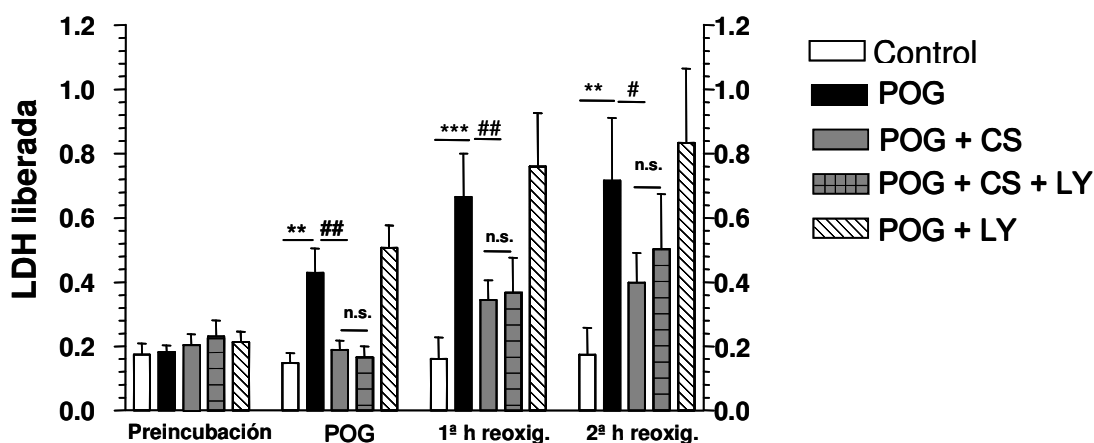


**Figura 37: El CS protege las rodajas de hipocampo de rata sometidas a POG en forma concentración-dependiente.** (A) LDH liberada al medio extracelular, de rodajas de hipocampo de rata sometidas a distintos tratamientos; según indican las barras situadas en la parte superior derecha de la figura, tras la hora de privación de oxígeno y glucosa (POG) y tras la 1ª y 2ª hora de re-oxigenación. Los datos están normalizados; se considera la lesión máxima (100%) la que aparece tras la POG en rodajas control sin fármaco, y el resto de los datos se expresan como porcentaje en relación a este valor. Los datos corresponden a la media y error estándar de 10 experimentos. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . (B) Representación de la LDH liberada de forma acumulada en el tiempo en las mismas condiciones experimentales que en la figura superior. Los datos corresponden a la media y error estándar de 10 experimentos. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

## RESULTADOS

### LA PROTECCIÓN MEDIADA POR CS EN RODAJAS DE HIPOCAMPO NO ESTÁ MEDIADA POR LA VÍA PI3K/AKT

Para determinar si el mecanismo neuroprotector del CS estaba relacionado con la vía PI3K/Akt realizamos experimentos de viabilidad con el inhibidor de esta vía, el LY-294002. El objetivo de estos experimentos era determinar si el LY-294002 podría revertir los efectos protectores del CS en este modelo experimental. Curiosamente y, a diferencia de lo que habíamos observado en las células SH-SY5Y, el inhibidor de la PI3K/Akt no inhibió el efecto protector del CS frente la POG (Fig. 38).

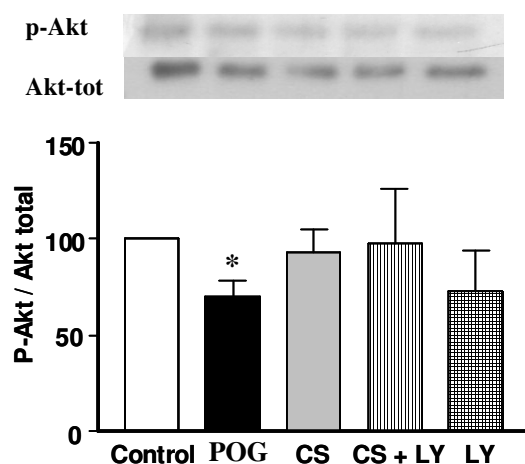


**Figura 38: Los efectos protectores del CS no se revierten por el antagonista de la vía PI3K/Akt, LY294002.** La co-aplicación de LY294002 (1  $\mu$ M) con CS (3 mM) no revirtió la protección ocasionada por el CS ni tras la hora de isquemia ni tras las dos horas de re-oxygenación. \*\*,  $p < 0.01$  y \*\*\*,  $p < 0.001$  respecto a la basal; #,  $p < 0.05$  y ##,  $p < 0.01$  respecto al grupo isquemia. n.s: no significativa la reversión con la co-aplicación de LY con CS. Los datos corresponden a la media más el error estándar de seis experimentos.

Al final de estos experimentos, se homogenizaron las rodajas en un tampón de lisis y se obtuvieron extractos de proteína para cuantificar por western blot Akt fosforilada y total. Los resultados se muestran en la figura 39. Tal como puede observarse, aunque la POG redujo de forma significativa la fosforilación de Akt, el CS no llegó a prevenir su defosforilación de forma significativa, aunque si se observó una tendencia. Estos resultados corroboran los resultados de viabilidad (Fig. 38) y apoyan que la vía PI3K/Akt no es determinante en la protección ofrecida por el CS en este modelo de isquemia-reoxigenación.



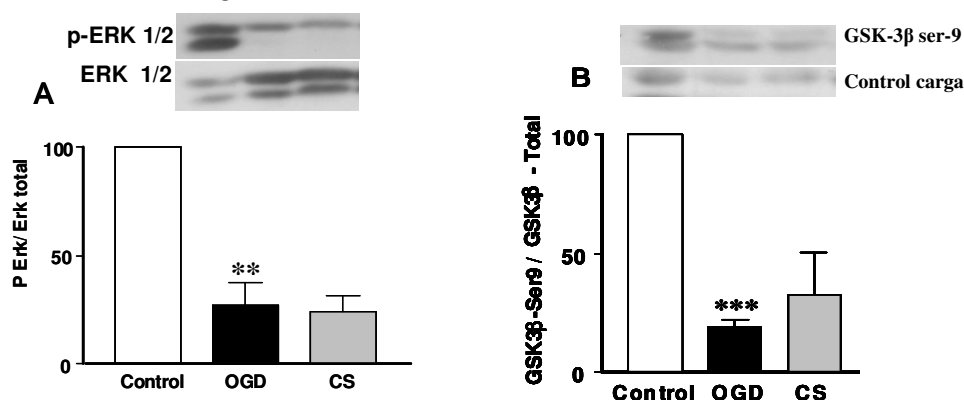
## RESULTADOS



**Figura 39:** Ni el CS ni el inhibidor de la vía PIK/Akt tienen efecto sobre la defosforilación de Akt inducida por la POG. La POG reduce de forma significativa la fosforilación de Akt, y la aplicación de CS no revierte esta defosforilación. La co-incubación de CS con el inhibidor de la vía PI3K/Akt el LY, tampoco tuvo efecto. Los datos corresponden a la media más el error estándar de 11 experimentos. \*,  $p < 0.05$  respecto al control.

### EXPLORACIÓN DE OTRAS VÍAS INTRACELULARES EN LA PROTECCIÓN MEDIADA POR CS

Ya que la vía PI3K/Akt no parecía estar implicada en el mecanismo neuroprotector del CS, exploramos por western blot, otras quinasas implicadas en vías de señalización de supervivencia como la ERK1/2 y la GSK-3 $\beta$ . En el caso de la ERK1/2, la POG-reoxigenación disminuyó por encima del 50% su fosforilación; sin embargo, el CS no previno su defosforilación (Fig. 40A). En el caso de la GSK-3 $\beta$  fosforilada en la serina 9, aunque la POG-reoxigenación también redujo de forma importante su fosforilación (75%), el CS tampoco fue capaz de prevenir su defosforilación (Fig. 40 B).



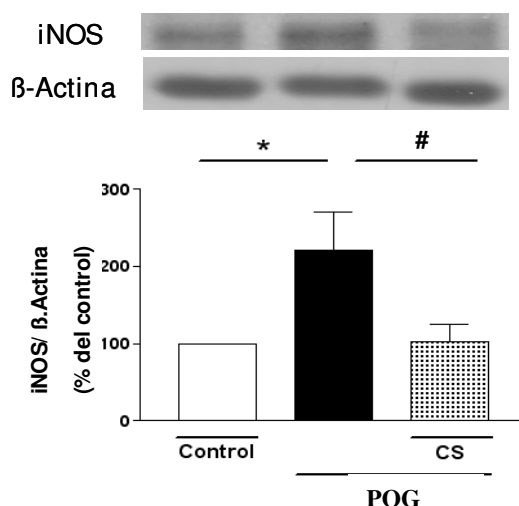
**Figura 40:** El CS no modificó la defosforilación de ERK1/2 (A) ni de GSK-3 $\beta$  en la serina 9 (B) inducidas por la POG-reoxigenación. Los extractos proteicos se obtuvieron de rodajas de hipocampo control (3 h en solución control) o tras 1h de POG seguida de 2 h de re-oxigenación en ausencia (POG) o presencia de 3 mM de CS (CS). Los datos corresponden a la media más el error estándar de entre 3 y 11 experimentos distintos. \*\*\* $p < 0.001$  respecto a la basal

## RESULTADOS

### EFFECTO DEL CS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE NO EN CONDICIONES DE POG-REOXIGENACIÓN

Puesto que, por una parte, habíamos observado que en los astrocitos el CS era capaz de reducir la inducción de iNOS ocasionada por LPS y, por otra, que durante la isquemia-reperfusión hay un incremento de la forma inducible de la NOS (iNOS), nos planteamos explorar esta vía en este modelo experimental con la idea de explicar el mecanismo protector del CS en este modelo experimental.

Para ello, analizamos por western blot, los niveles de iNOS en rodajas de hipocampo en condiciones control y sometidas a 1h de POG seguido de 2h de reoxigenación, en ausencia o presencia de CS (3 mM). Tal como puede observarse en la figura 41, la POG-reoxigenación duplicó la expresión de iNOS, y el tratamiento con CS inhibió de forma casi completa su inducción (Fig. 41).

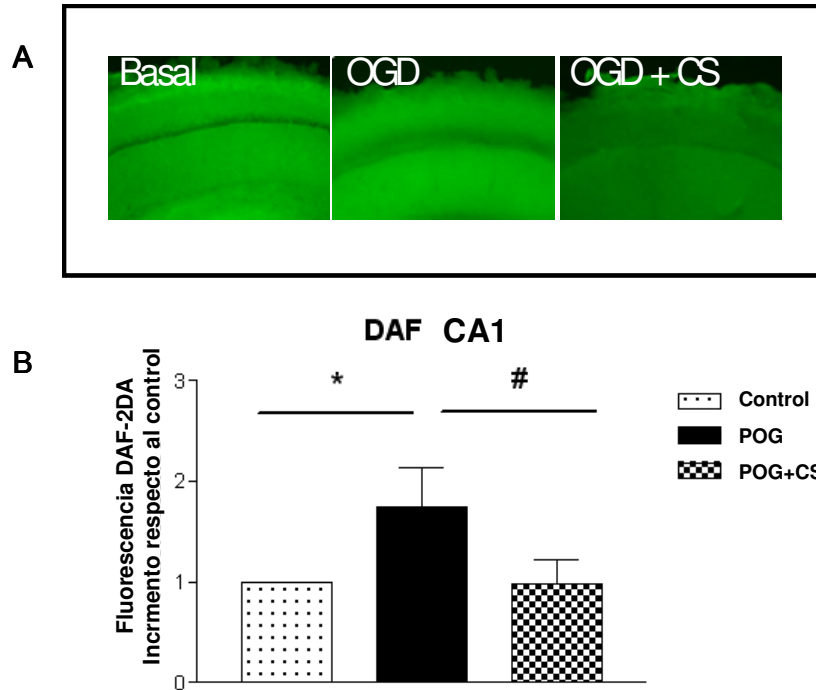


**Figura 41: EL CS inhibe la inducción de iNOS ocasionada por POG-reoxigenación.** Western blot de iNOS y actina obtenido de extractos proteicos de rodajas de hipocampo no sometidas a POG y sometidas a POG (1h) seguido de reoxigenación (2h), en ausencia o presencia de CS (3 mM). La expresión de iNOS aumentó de forma significativa en el grupo de POG-reoxigenación (POG) respecto al grupo control, y este aumento fue inhibido por el CS. Los datos corresponden a la media y error estándar de al menos 8 experimentos por variable. \* $p < 0.05$  respecto a la basal; # $p < 0.05$  respecto a POG solo.

Para corroborar que la inhibición de iNOS se relacionaba con una reducción de NO, empleamos la sonda fluorescente DAF como medida indirecta de radicales NO. Al finalizar el experimento de POG-reoxigenación, en las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente, las rodajas se tiñeron DAF y en un microscopio de fluorescencia y se tomaron imágenes para analizar su fluorescencia en las áreas hipocampales CA1 y CA3. Tras la POG-reoxigenación, la fluorescencia de DAF se

## RESULTADOS

duplicó respecto a la fluorescencia detectada en las rodajas no isquémicas (control); en las rodajas incubadas con CS y sometidas a POG-reoxigenación, los niveles de fluorescencia se vieron reducidos de forma significativa en el área CA1 (Fig. 42).



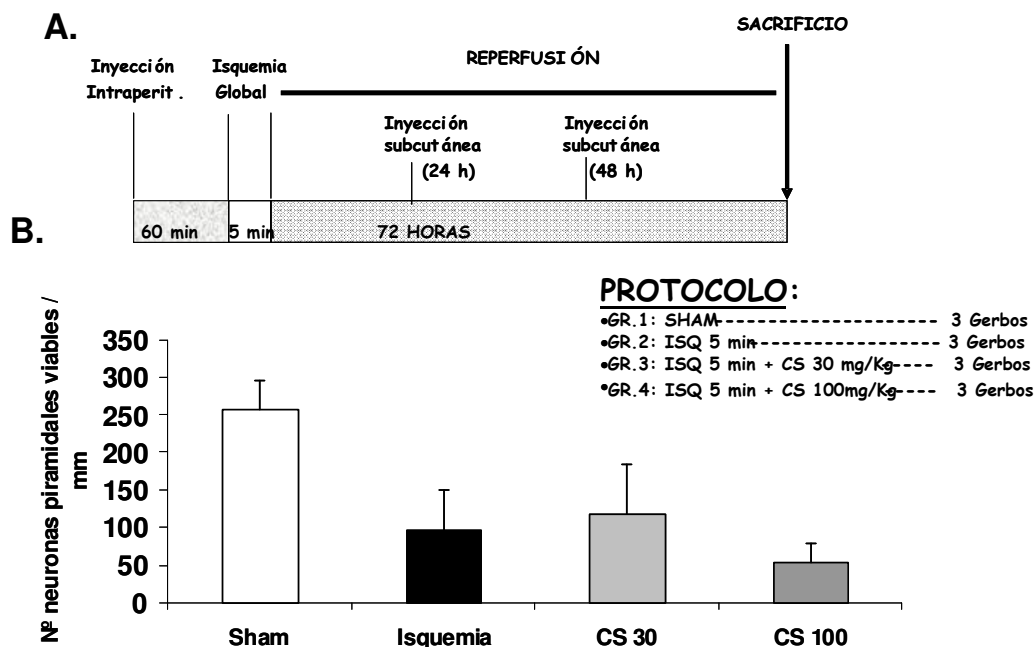
**Figura 42: El CS reduce la generación de NO tras POG-reoxigenación.** El NO se valoró empleado la sonda fluorescente sensible a NO, diaminofluoresceína (DAF). A. Microfotografías tomadas en microscopio a 20 X de la zona CA1 del hipocampo en las 3 condiciones experimentales teñidas con la sonda DAF. B. Datos agrupados de las medidas de fluorescencia; la POG-reoxigenación (POG) aumentó la producción de NO en la capa CA1 del hipocampo de forma significativa. Dichos niveles se redujeron a niveles casi basales en presencia de CS (3 mM). \* $p < 0.05$  respecto a la basal; # $p < 0.05$  respecto al grupo POG. Los datos corresponden a la media más el error estándar de 7 experimentos.

## RESULTADOS

### 3.4. EFECTO DEL CS EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL EN EL GERBO

Este estudio preliminar se planificó para evaluar si los efectos neuroprotectores observados en los modelos “*in vitro*” se conservarían en un modelo “*in vivo*” de isquemia cerebral. Para ello hemos utilizado el modelo de isquemia cerebral global en el jerbo según el protocolo descrito en la figura 43A. La oclusión bilateral de las arterias carótidas durante 5 minutos produce una lesión selectiva de las neuronas piramidales del hipocampo, que es máxima a las 72 horas post-isquemia. Tras este periodo, los animales se anestesian y se perfunden para analizar, en cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, el número de neuronas piramidales viables.

La isquemia cerebral global redujo la viabilidad de las neuronas de la capa CA1 en un 60 % respecto a los animales que fueron sometidos a la misma cirugía pero a los que no se les practicó la oclusión de la carótidas (grupo SHAM). En los jerbos tratados a las dosis de 30 y 100 mg/Kg de CS, 60 minutos antes de la isquemia y durante los dos días siguientes a la misma, no se observaron incrementos en el número de neuronas piramidales viables, es decir, no hubo neuroprotección (Fig. 43B).

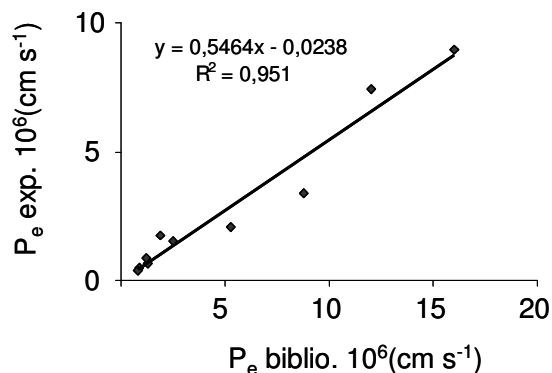


**Figura 43: El CS no revierte el daño neuronal producido por una isquemia cerebral global en gerbo.** A. Protocolo de los grupos y la forma de administración del CS en los animales. B. Número de neuronas viables por grupo de tratamiento. El grupo sham presenta un número muy elevado de neuronas en la capa CA1 del hipocampo. La isquemia reduce drásticamente la viabilidad neuronal, y el CS no fue capaz a ninguna de las dos dosis 30 y 100 mg/kg de prevenir este daño. Los datos corresponden a la media más error estándar de 3 animales por grupo.

## RESULTADOS

Una posible explicación a esta falta de efecto “in vivo” podría ser que el CS, dado su elevado peso molecular, no atravesara la barrera hematoencefálica. Dado que no disponíamos de la tecnología para medir los niveles en cerebro de CS empleamos un modelo “in vitro” predictivo del paso de sustancias a través de la barrera hematoencefálica (vea Materiales y Métodos para mayor detalle del método). Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. María Isabel Rodríguez Franco del Instituto de Química Médica del CSIC.

Tal como puede observarse en la tabla I, se comparó la probabilidad de cruzar la BHE del CS con otros 10 compuestos que sí se conoce su capacidad para atravesar la dicha membrana en este modelo “in vitro”. Los resultados obtenidos mostraron que el CS no atravesaría la barrera hematoencefálica; posee una  $P_e$  Exp de 0.42 en comparación con el  $P_e$  Exp de 7.43 que posee la desipramina, que sí atraviesa bien la BHE. Por tanto cabe pensar que la falta de eficacia en el modelo de isquemia global “in vivo” pueda atribuirse a que el CS no fue capaz de atravesar la BHE y, por tanto, llegar a su órgano diana.



Validación del experimento				
Productos	$P_e$ Bibl. ( $10^{-6}$ )	$P_e$ Exp. ( $10^{-6}$ ) <sup>a</sup>		DS
Verapamilo	16	8,95	±	0,671
Desipramina	12	7,43	±	0,036
Promazina	8,8	3,41	±	0,194
Clonidina	5,3	2,05	±	0,282
Piroxicam	2,5	1,52	±	0,041
Hidrocortisona	1,9	1,75	±	0,069
Cafeína	1,3	0,65	±	0,002
Aldosterona	1,2	0,86	±	0,046
Enoxacina	0,9	0,49	±	0,017
Ofloxacina	0,8	0,37	±	0,022
Condroitín Sulfato		0,059	±	0,059
snc+		> 2,2		
snc-		< 1,1		

**Tabla I:** Experimento de paso de BHE por el CS en comparación con compuestos conocidos que sí que la atraviesan. El S obtiene un coeficiente menor de 2.2 que es lo necesario para considerar que podría atravesar la BHE.



### 4.1 Protección mediada por CS en células de neuroblastoma SH-SY5Y frente a radicales libres

En la primera parte de este trabajo, se muestra que el CS, un GAG de la red perineuronal, puede proteger las células SH-SY5Y frente al estrés oxidativo vía PI3K/Akt y la inducción de la enzima antioxidante HO-1 vía PI3K/Akt.

Se han utilizado dos modelos de toxicidad inducida por radicales libres para evaluar el efecto protector del CS. El primer modelo consistió en aportar una fuente de ROS exógena incubando las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y el segundo modelo consistió en la interrupción de la cadena respiratoria en el complejo I (rotenona) y V (oligomicina-A); en este caso la mitocondria se despolariza, se produce una depleción de energía, aumenta la producción de ROS, y finalmente, la célula muere. El CS se mostró capaz de proteger las células de neuroblastoma frente a ambos estímulos, aunque con diferencias. Por ejemplo, la protección frente a Rot/oligo se produjo a concentraciones más bajas (0.3-3  $\mu$ M) de CS que frente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60-1000  $\mu$ M). Sin embargo, a nivel de protección, el CS se mostró más eficiente frente a ROS exógenos que endógenos, ya que revirtió completamente la muerte producida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero solo redujo en torno al 50% la provocada por Rot/oligo. Una posible explicación a este fenómeno, puede deberse a la propiedad del CS de secuestrar radicales libres *per sé*, y que a altas concentraciones esté quelando los radicales generados por la administración exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se ha descrito que las cadenas de GAG de la red perineuronal son estructuras altamente cargadas que rodean las neuronas y que pueden, potencialmente, actuar como un sistema tampón para iones fisiológicamente importantes como el calcio, el potasio y el sodio (Morawski et al., 2004). Mediante su efecto secuestrador y quelante de iones redox activos, la red perineuronal se muestra capaz de neutralizar o reducir el potencial oxidante local que rodea las neuronas, protegiéndolas de las secuelas del estrés oxidativo.

Los efectos protectores de los GAG en modelos de estrés oxidativo se han demostrado por otros grupos, aunque por mecanismos que difieren del que se propone en este trabajo. Por ejemplo, GAGs como el ácido hialurónico y el CS han demostrado actividad antioxidante en modelos *in vitro* e *in vivo*. (Arai et al., 1999; Campo et al., 2004), por un mecanismo relacionado con su capacidad para quelar metales de transición como Cu<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup>, que son, en último término, los responsables de la iniciación de la reacción de Harber-Weiss y la de Fenton. Por otro lado, Campo y colaboradores demostraron que el ácido hialurónico y el C4S pueden disminuir la

muerte celular al reducir la oxidación de proteínas, la generación de OH y la peroxidación lipídica, por aumentar las defensas antioxidantes mediante un aumento de la superóxido dismutasa y la actividad catalasa (Campo et al., 2004).

Sin embargo, los resultados de esta tesis muestran que el CS posee un efecto adicional, que está relacionado con la inducción de la enzima antioxidante HO-1.

La HO-1 es una enzima antioxidante con dos isoformas: la isoforma inducible HO-1 y la enzima constitutiva HO-2. La HO-1 es inducida en respuesta a una gran variedad de condiciones patológicas que inducen estrés (Keyse and Tyrrell, 1987). Estudios en ratones deficientes en HO-1 han demostrado que el sistema HO es indispensable para la protección de la célula frente a estrés oxidativo (Poss and Tonegawa, 1997a; Poss and Tonegawa, 1997b). La expresión de HO-1 es muy baja en neuronas (Maines, 2004) y su inducción está relacionada con la protección frente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kim et al., 2005), isquemia focal (Nimura et al., 1996) y excitotoxicidad por glutamato (Parfenova et al., 2006). En enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, se ha visto en cerebros postmortem de pacientes, que las neuronas del córtex y del hipocampo tenían inducida la expresión de HO-1, y también se ha encontrado co-localizada con los ovillos neurofibrilares (Schipper et al., 1995). Por lo tanto, está generalmente aceptado que la inducción de HO-1 representa un mecanismo fisiológico protector frente a estrés oxidativo. En esta tesis, el CS se ha mostrado capaz de aumentar HO-1, y este aumento estuvo relacionado con su capacidad protectora, ya que cuando se inhibió la actividad de HO-1 con snPP, los efectos protectores del CS se perdieron.

El hecho de que el inhibidor de la PKC, queleritrina, inhibiera la fosforilación de Akt inducida por CS, indica que la PKC participa en la cascada de señalización de Akt. La sobreexpresión de HO-1 también se redujo por queleritrina y LY294002, indicando que la PKC y la vía PI3K/Akt están participando en la inducción de esta enzima antioxidante. Estos resultados coinciden con otros en los que se reveló citoprotección por el factor de crecimiento neurotrófico frente a la toxina parkinsoniana 6-hidroxidopamina, donde Salinas y colaboradores (Salinas et al., 2003) mostraron que la sobreexpresión de HO-1, inducida por el factor de crecimiento neurotrópico, estaba mediada por la vía PI3K. La participación de la vía de supervivencia PI3K/Akt en la regulación de HO-1 se ha descrito en otros contextos celulares, incluyendo la respuesta a IL-10, factor de crecimiento hepático (Ricchetti et al., 2004; Tacchini et al., 2004),



endotoxina, arseniato, hemina y carnosol (Arruda et al., 2004; Martin et al., 2004; Cheng et al., 2005; Ivanov and Hei, 2005).

Una observación interesante de este estudio es que la inducción de HO-1 inducida por el CS no fue muy grande, sugiriendo un papel fisiológico de protección. Una inducción muy alta de la actividad de HO-1 como la observada en las placas seniles del Alzheimer, y los cuerpos de Lewy del Parkinson, o la inducción con hemina, no son compatibles con la viabilidad celular, por que compromete la capacidad del hemo para la función de las hemoproteínas, produciéndose la liberación de gran cantidad de hierro, que puede inducir un aumento de los radicales libres a través de la reacción de Fenton (Schipper, 2004). Un modesto aumento de la actividad de HO-1 da como resultado un modesto incremento de biliverdina/bilirrubina, y está descrito que cantidades nanomolares de bilirrubina reduce cantidades micromolares de  $H_2O_2$  (Dore et al., 1999). Por tanto, un pequeño aumento de la actividad HO-1 puede proporcionar una protección antioxidante efectiva sin comprometer la viabilidad celular.

Considerando que las neuronas están sujetas a altos niveles de ROS, la inducción de HO-1 por CS puede atenuar el estrés oxidativo y la muerte celular inducida por  $H_2O_2$ , o por la interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial en los complejos I y V.

La inducción de la enzima antioxidante HO-1, se correlacionó con una disminución en la producción de ROS, tal como demostraron los experimentos con la sonda fluorescente DFCDA; el CS fue capaz de reducir tanto los ROS endógenos secundarios al bloqueo mitocondrial como los ROS exógenos generados por  $H_2O_2$ .

### **4.2 Inhibición de la activación de NFκB en astrocitos mediada por CS**

Está descrito que el CS puede alterar los componentes de la cascada inflamatoria, incluyendo la disminución de la prostaglandina-2 en el cartílago articular (Chou et al., 2005), y disminuyendo la producción de IL-6 y TNF-alfa en la artritis reumatoide en una línea celular mastocítica humana (Choi et al., 2004). Por otro lado, la combinación de CS y glucosamina también reduce el nivel de IL-1β en un modelo de osteoartritis de conejo (Chou et al., 2005). Hay numerosos estudios que demuestran la capacidad antiinflamatoria del CS. Tras la administración oral de una combinación de CS y glucosamina, se analizó el líquido sinovial y la sangre en explantes de cartílago bovino estimulado con IL-1β, esta asociación inhibió la inducción de los genes de iNOS, COX-2 y NFκB y redujo la expresión de NO y prostaglandina-2. También

suprimió la síntesis y expresión de los genes inflamatorios y enzimas proteolíticas, sugiriendo el mecanismo de acción antiinflamatorio y condroprotector. (Chan et al., 2005a; Chan et al., 2006).

Por otro lado, el NFκB es un factor de transcripción pleiotrópico activado por bajos niveles de ROS y moléculas pro-inflamatorias. (Mantena and Katiyar, 2006; Campo et al., 2008a). Este factor regula la expresión de multitud de genes que regulan la inflamación, la respuesta inmune y el estrés (Kumar et al., 2004; Piva et al., 2006). Uno de los estímulos más utilizado para inducir la vía NFκB es el LPS, que activa específicamente el receptor TLR-4, que a su vez activa la vía de éste factor nuclear (Doyle and O'Neill, 2006).

El CS, según los datos obtenidos en este trabajo, es capaz de reducir la activación de la vía NFκB en respuesta a un estímulo inflamatorio como es el LPS en células gliales del SNC, más concretamente, en cultivos de astrocitos purificados. La activación de la vía NFκB cursa con la traslocación de la subunidad p65 al núcleo, donde se une al ADN y transcribe los genes anteriormente mencionados. La inmunocitoquímica contra la subunidad p65, mostró una reducción de la fluorescencia focalizada en el núcleo cuando se co-aplicó el CS con LPS. Esta reducción de p65 en la fracción nuclear se pudo cuantificar cuando se separó la fracción nuclear de las células y se cuantificó la cantidad de p65 presente en cada grupo de tratamiento.

Para investigar si esta reducción de la traslocación de la subunidad de NFκB al núcleo tenía una traducción génica, se investigó la expresión de ciertos genes activados por esta vía. Como el factor NFκB puede también activarse por la vía de la JAK/STAT, (Gloire et al., 2006), se planteó explorar si la activación de NFκB era mediada por esta vía. Se realizaron RT-PCR para el mensajero de SOCS-1, una molécula que se transcribe al activarse esta vía, y tiene una función de retroalimentación negativa en la misma. También se investigó IP-10, otra molécula que tiene un promotor específico para cuando NFκB es activado por mediación de los receptores TLR-3 y TLR-4 (Doyle and O'Neill, 2006). No se vio ninguna diferencia en la expresión de estos genes en presencia de CS, sugiriendo que la reversión de la activación de NFκB mediada por CS no tiene relación con la vía JAK/STAT. Sin embargo, el TNF-alfa si que vio reducidos sus niveles de expresión en presencia de CS. El TNF-alfa, junto con el interferón gamma, son las dos principales moléculas pro-inflamatorias transcritas por la activación de NFκB. Estas moléculas, a su vez, son capaces de activar receptores de citoquinas, amplificando de manera autocrina la acción del estímulo inflamatorio. La reducción de

los niveles de TNF-alfa tiene implicaciones fisiológicas protectoras muy relevantes, ya que reduce el estado de activación glial y, por tanto, la liberación de más citoquinas y generación de ROS.

Se ha investigado también el posible papel que pueden tener los ROS en la activación de NFκB por LPS. El pretratamiento con diferentes antioxidantes, antes de aplicar el LPS bloqueó la activación de NFκB y la síntesis de citoquinas. (Ryan et al., 2004), sugiriendo que los ROS son mediadores de la activación de NFκB junto al LPS.

El CS tiene un importante papel anti radicales libres como se ha mencionado anteriormente, bien como secuestrador de los mismos, bien como mediador de activación de procesos celulares protectores como la síntesis de enzimas antioxidantes. La relación de los dos estímulos, los ROS y el LPS en la activación de NFκB podría explicar el efecto protector mediado por el CS en astrocitos, reduciendo la liberación de TNF-alfa.

Los estímulos pro-inflamatorios y, concretamente, el LPS, están implicados a su vez en la generación de radicales libres (Park et al., 2004). Por ello, se investigaron los genes que estando implicados en la generación de ROS, fuesen a su vez dianas de transcripción del NFκB. Se seleccionaron la iNOS, responsable de la producción de NO, y la COX-2. La determinación de iNOS y COX-2 por western blot mostraron que el CS era capaz de revertir la expresión de ambas enzimas de forma significativa tras dos horas de exposición con LPS; a cuatro horas solo fue capaz de revertir significativamente la expresión de iNOS, aunque la COX-2 mostró una tendencia.

Estos datos en conjunto, sugieren que el CS puede inhibir la activación de la vía NFκB, por un mecanismo independiente de la vía JAK/STAT.

Es posible que la activación de NFκB por LPS pueda estar influenciada por la capacidad del CS para disminuir la producción de ROS generados por LPS; ello se sustenta en que NFκB se puede activar por ROS y el CS puede reducir la generación de ROS tal como se ha podido observar en esta tesis en los resultados obtenidos en los cultivos de SH-SY5Y y en las rodajas de hipocampo de rata.

### 4.3 Protección mediada por CS en rodajas de hipocampo sometidas a POG

La privación de oxígeno y glucosa en preparaciones de cerebro se considera un modelo *in vitro* de isquemia (Arias et al., 1999). Las rodajas de hipocampo de rata sometidas a POG, permiten la evaluación de la degeneración neural y el análisis del estrés oxidativo y las vías por las que se produce.

El CS mostró una protección concentración dependiente de la muerte celular en este modelo de isquemia. La LDH es una enzima citoplasmática, que al encontrarse en el medio se considera marcador de muerte celular. Los niveles de LDH acumulada disminuyeron en torno al 75% al incubar las rodajas con CS durante el experimento en la dosis de 3 mM, que fue a la que más protegió. La necesidad de una dosis tan alta en este modelo se puede explicar por el hecho de que el CS debe difundir a través del tejido hasta llegar a las capas más profundas de la rodaja, mientras que en los cultivos celulares, se aporta directamente al medio, estando disponible para las células directamente.

Como en las células la protección del CS estuvo mediada por la vía PI3/Akt, se planteó la posibilidad de que el mecanismo protector fuera el mismo. Para comprobarlo, se co-incubaron las rodajas con CS y LY-294002, inhibidor de esta vía, pero no se observó ningún efecto sobre la protección mediada por CS, lo que parecía indicar que el mecanismo protector en células y rodajas es diferente. Para confirmar que el CS no tenía efecto sobre la vía PI3K/Akt, se determinó, western blot, los niveles de Akt fosforilado, y se corroboró que, efectivamente no ejercía ninguna influencia sobre la activación, o fosforilación, de Akt. Se exploraron también por western blot la vía de las MAPK, (ERK1/2) y las GSK-3 $\beta$  ya que en células no estaban implicadas pero el mecanismo protector en rodajas era diferente. Tampoco ninguna de estas enzimas se vio alterada por la presencia de CS. Se sabe que en la re-oxigenación, tras la POG es cuando se produce una generación masiva de ROS, principalmente en la cadena respiratoria de la mitocondria, que contribuyen a agravar el daño isquémico (Turrens, 2003). Un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, dianas para la peroxidación lipídica, unido a la baja actividad de las enzimas antioxidantes tornan el cerebro especialmente vulnerable al ataque de los ROS (Cooper and Kristal, 1997). Estos procesos neurotóxicos se correlacionan directamente con la muerte celular que cursa en la isquemia y las enfermedades neurodegenerativas (Ames et al., 1993; Coyle and

Puttfarcken, 1993; Jenner, 1994). Puesto que el CS había mostrado propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en los cultivos celulares, nos planteamos estudiar si el efecto neuroprotector del CS podría estar relacionado con enzimas que participan en dichos procesos. Concretamente estudiamos la COX-2, la Mn-SOD y la iNOS. En el caso de la COX-2 y Mn-SOD no observamos modificaciones significativas ocasionados por la POG-reoxigenación (datos no mostrados) ni en condiciones control ni en presencia de CS.

El papel de los ROS en los episodios isquémicos es, por tanto, muy relevante, sobre todo en el periodo de re-oxigenación. Asimismo, un incremento en la producción de NO por la iNOS es responsable de ciertos mecanismos implicados en la muerte celular tras la isquemia (Endoh et al., 1994). Hay muchas evidencias que demuestran que los ROS junto con las especies reactivas de nitrógeno, que incluyen NO, son mediadores de neurotoxicidad, especialmente en respuesta al glutamato que actúa vía NMDA (Dawson et al., 1991; Coyle and Puttfarcken, 1993). La producción exacerbada de NO mediada por iNOS parece contribuir al daño tisular que ocurre tras una isquemia cerebral, ya que la expresión de iNOS aumenta durante el periodo de re-oxigenación tras una isquemia *in vivo* o *in vitro* (Cardenas et al., 1998; Cardenas et al., 2000). En las condiciones experimentales de POG-reoxigenación empleadas en esta tesis, también observamos una inducción de más del doble de iNOS. Sin embargo, en las rodajas tratadas con CS se observó una clara inhibición de la inducción de iNOS. Para comprobar si esta reducción de la expresión tenía un efecto funcional, se midió la producción de óxido nítrico. Se utilizó la sonda fluorescente DAF, que se oxida en presencia de óxido nítrico, y se puede medir su fluorescencia, haciendo, así, una medida indirecta de la generación de NO. Los datos obtenidos con esta sonda, fueron congruentes con lo que se había observado por western blot; en la capa CA1 del hipocampo, la más sensible al daño isquémico, la POG en rodajas aumentó la producción de NO y la presencia de CS la redujo a niveles control. Estos resultados perfilan la vía de la protección del CS en rodajas, ya que es posible que esté interfiriendo con la producción de NO protegiendo el tejido del daño producido por las especies reactivas de nitrógeno. Esto concuerda con recientes estudios que revelan que el CS es capaz de reducir la expresión de iNOS (Chan et al., 2005b; Campo et al., 2008b; Xu et al., 2008), y por tanto de NO.

### 4.4 El CS no protege en un modelo de isquemia cerebral global en jerbo

Los modelos animales de isquemia se utilizan como paso previo de ensayos clínicos en pacientes. En este caso, el modelo utilizado es el de provocar una isquemia cerebral global anterior en el jerbo, que se ha demostrado que causa daño específico como apoptosis en las neuronas piramidales de la capa CA1 del hipocampo.(Lorrio et al., 2007).

Tras los buenos resultados en modelos *in vitro* de protección por CS, se planteó estudiar de los posibles efectos protectores del mismo en un modelo *in vivo*. Para ello se siguió un protocolo de administración del fármaco de una dosis 60 minutos antes de la isquemia vía intraperitoneal, y luego una inyección subcutánea cada 24 horas durante 72 horas y hasta el sacrificio.

Tras el protocolo experimental, se contaron las neuronas viables de la capa CA1, de forma doble ciego, teñidas con hematoxilina-eosina. El daño provocado por la isquemia en estas neuronas fue muy evidente en comparación con el grupo control de cirugía simulada. Sin embargo, ni la dosis de 30 mg/Kg ni la de 100 mg/Kg de CS tuvo ningún efecto aparente en este daño.

La explicación a esta falta de protección *in vivo* puede deberse a la dificultad de atravesar la BHE del CS, ya que es una molécula muy grande (13500 Da). Para comprobar si esto podía ser así, se recurrió al laboratorio de la Dra. María Isabel Rodríguez del Instituto de Química Médica (CSIC), quienes tienen un modelo *ex vivo* para dar las probabilidades estadísticas que posee un compuesto para atravesar la BHE. Efectivamente, el coeficiente alcanzado por el CS no lo hacía un candidato probable para atravesar la BHE por difusión pasiva. Sin embargo, hay estudios que revelan que un oligosacárido, el AOSC, se detectó en el líquido cefaloraquídeo tras una administración intravenosa y oral (Guo et al., 2006), sugiriendo que tal vez otro protocolo de administración del CS, que diera tiempo a la enzima endógena que lo digiere en fragmentos más pequeños, la condroitinasa ABC, a actuar, podría dar fragmento de oligosacáridos capaces de atravesar la BHE y actuar en el cerebro.(Lin et al., 2008)

**CONCLUSIONES**

---

---

## CONCLUSIONES

---

De los resultados presentados en esta tesis, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El CS protege las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y frente a modelos de estrés oxidativo mediante la inducción de la enzima antioxidante HO-1, a través de la vía de señalización intracelular PI3K/Akt.

2. El CS inhibe la expresión de las citoquinas TNF-alfa, COX-2 e iNOS inducida por LPS en astrocitos de rata. Este efecto se relaciona con la inhibición de la vía NFκB.

3. En un modelo de POG-reoxigenación en rodajas de hipocampo, el CS previene la muerte celular y la producción de NO mediante la inhibición de la inducción de iNOS.

4. El CS a 30 mg/Kg y 100 mg/Kg no protege frente a la degeneración neuronal en la capa CA1 de hipocampo provocada por una isquemia cerebral global en el jerbo.

Como conclusión general, el condroitina sulfato ha mostrado propiedades neuroprotectoras en modelos *in vitro* relacionados con la fisiopatología de la isquemia cerebral, a saber, ha mostrado propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Aunque no haya mostrado eficacia neuroprotectora *in vivo*, los resultados *in vitro* animan a conseguir estructuras químicas más pequeñas derivadas del CS que puedan atravesar la BHE y conseguir los efectos neuroprotectores y antiinflamatorios ya demostrados para el CS.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---

---

- Albertini R and Abuja PM (1999) Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radic Res* **30**:181-188.
- Albertini R, De Luca G, Passi A, Moratti R and Abuja PM (1999) Chondroitin-4-sulfate protects high-density lipoprotein against copper-dependent oxidation. *Arch Biochem Biophys* **365**:143-149.
- Allan SM and Rothwell NJ (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* **2**:734-744.
- Ames BN, Shigenaga MK and Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:7915-7922.
- Anisman H, Merali Z and Hayley S (2008) Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol* **85**:1-74.
- Arai H, Kashiwagi S, Nagasaka Y, Uchida K, Hoshii Y and Nakamura K (1999) Oxidative modification of apolipoprotein E in human very-low-density lipoprotein and its inhibition by glycosaminoglycans. *Arch Biochem Biophys* **367**:1-8.
- Arias RL, Tasse JR and Bowlby MR (1999) Neuroprotective interaction effects of NMDA and AMPA receptor antagonists in an in vitro model of cerebral ischemia. *Brain Res* **816**:299-308.
- Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C and Graca-Souza AV (2004) Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol* **173**:2023-2030.
- Bosshart H and Heinzelmann M (2007) Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin. *Ann N Y Acad Sci* **1096**:1-17.
- Bruyere O and Reginster JY (2007) Glucosamine and chondroitin sulfate as therapeutic agents for knee and hip osteoarthritis. *Drugs Aging* **24**:573-580.
- Cael JJ, Winter WT and Arnott S (1978) Calcium chondroitin 4-sulfate: molecular conformation and organization of polysaccharide chains in a proteoglycan. *J Mol Biol* **125**:21-42.
- Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Traina P, Sama D and Calatroni A (2008a) The antioxidant effect exerted by TGF-1beta-stimulated hyaluronan production reduced NF-kB activation and apoptosis in human fibroblasts exposed to FeSo4 plus ascorbate. *Mol Cell Biochem* **311**:167-177.

- Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Traina P, Sama D and Calatroni A (2008b) Purified human plasma glycosaminoglycans reduced NF-kappaB activation, pro-inflammatory cytokine production and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. *Innate Immun* **14**:233-246.
- Campo GM, D'Ascola A, Avenoso A, Campo S, Ferlazzo AM, Micali C, Zanghi L and Calatroni A (2004) Glycosaminoglycans reduce oxidative damage induced by copper (Cu+2), iron (Fe+2) and hydrogen peroxide (H2O2) in human fibroblast cultures. *Glycoconj J* **20**:133-141.
- Cardenas A, De Alba J, Moro MA, Leza JC, Lorenzo P and Lizasoain I (1998) Protective effect of N-(3-(aminomethyl)benzyl) acetamidine, an inducible nitric oxide synthase inhibitor, in brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation. *Eur J Pharmacol* **354**:161-165.
- Cardenas A, Moro MA, Hurtado O, Leza JC, Lorenzo P, Castrillo A, Bodelon OG, Bosca L and Lizasoain I (2000) Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *J Neurochem* **74**:2041-2048.
- Castro-Pacheco A, Foyo-Niembro E, Perez-Perez V, Garcia-Hernandez J and Grijalva I (2001) [Carotid-basilar artery communication in gerbils (Meriones unguiculatus)]. *Rev Neurol* **32**:225-228.
- Clifton GL, Taft WC, Blair RE, Choi SC and DeLorenzo RJ (1989) Conditions for pharmacologic evaluation in the gerbil model of forebrain ischemia. *Stroke* **20**:1545-1552.
- Cooper AJ and Kristal BS (1997) Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol Chem* **378**:793-802.
- Coyle JT and Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**:689-695.
- Curtin JF, Donovan M and Cotter TG (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* **265**:49-72.
- Chan PS, Caron JP and Orth MW (2005a) Effect of glucosamine and chondroitin sulfate on regulation of gene expression of proteolytic enzymes and their inhibitors in interleukin-1-challenged bovine articular cartilage explants. *Am J Vet Res* **66**:1870-1876.

- Chan PS, Caron JP and Orth MW (2006) Short-term gene expression changes in cartilage explants stimulated with interleukin beta plus glucosamine and chondroitin sulfate. *J Rheumatol* **33**:1329-1340.
- Chan PS, Caron JP, Rosa GJ and Orth MW (2005b) Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage* **13**:387-394.
- Cheng AM, Moore EE, Johnson JL, Walsh MD, Ao L, Moore PK and Banerjee A (2005) Polymerized hemoglobin induces heme oxygenase-1 protein expression and inhibits intercellular adhesion molecule-1 protein expression in human lung microvascular endothelial cells. *J Am Coll Surg* **201**:579-584.
- Cheng Q, Cant CA, Moll T, Hofer-Warbinek R, Wagner E, Birnstiel ML, Bach FH and de Martin R (1994) NK-kappa B subunit-specific regulation of the I kappa B alpha promoter. *J Biol Chem* **269**:13551-13557.
- Choi IY, Jung HS, Kim HR, Lee EJ, Lee EH, Shin TY, Kim HM and Hong SH (2004) OK205 regulates production of inflammatory cytokines in HMC-1 cells. *Biol Pharm Bull* **27**:1871-1874.
- Chou MM, Vergnolle N, McDougall JJ, Wallace JL, Marty S, Teskey V and Buret AG (2005) Effects of chondroitin and glucosamine sulfate in a dietary bar formulation on inflammation, interleukin-1beta, matrix metalloprotease-9, and cartilage damage in arthritis. *Exp Biol Med (Maywood)* **230**:255-262.
- Christophe M and Nicolas S (2006) Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Curr Pharm Des* **12**:739-757.
- Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS and Snyder SH (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:6368-6371.
- Dore S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R, Hester LD, Guastella D and Snyder SH (1999) Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:2445-2450.
- Doyle SL and O'Neill LA (2006) Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* **72**:1102-1113.
- Dunstone JR (1960) Ion-exchange reactions between cartilage and various cations. *Biochem J* **77**:164-170.

- Durukan A, Strbian D and Tatlisumak T (2008) Rodent models of ischemic stroke: a useful tool for stroke drug development. *Curr Pharm Des* **14**:359-370.
- Endoh M, Maiese K and Wagner J (1994) Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res* **651**:92-100.
- Fernandez-Gomez FJ, Hernandez F, Argandona L, Galindo MF, Segura T and Jordan J (2008) [Pharmacology of neuroprotection in acute ischemic stroke.]. *Rev Neurol* **47**:253-260.
- Flynn RW, Macwalter RS and Doney AS (2008) The cost of cerebral ischaemia. *Neuropharmacology* **55**:250-256.
- Ghosh S (1999) Regulation of inducible gene expression by the transcription factor NF-kappaB. *Immunol Res* **19**:183-189.
- Gloire G, Legrand-Poels S and Piette J (2006) NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* **72**:1493-1505.
- Graham SH, Shiraishi K, Panter SS, Simon RP and Faden AI (1990) Changes in extracellular amino acid neurotransmitters produced by focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett* **110**:124-130.
- Green AR and Shuaib A (2006) Therapeutic strategies for the treatment of stroke. *Drug Discov Today* **11**:681-693.
- Grimm S and Baeuerle PA (1994) Failure of the splicing variant p65 delta of the NF-kappa B subunit p65 to transform fibroblasts. *Oncogene* **9**:2391-2398.
- Guo X, Xin X, Gan L, Nie Q and Geng M (2006) Determination of the accessibility of acidic oligosaccharide sugar chain to blood-brain barrier using surface plasmon resonance. *Biol Pharm Bull* **29**:60-63.
- Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**:140-155.
- Hayashi N, Mizusaki MJ, Kamei K, Harada S and Miyata S (2005) Chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan associates with parallel fibers and modulates axonal extension and fasciculation of cerebellar granule cells. *Mol Cell Neurosci* **30**:364-377.
- Hossmann KA (2006) Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* **26**:1057-1083.
- Iozzo RV (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* **67**:609-652.

- Ischiropoulos H and Beckman JS (2003) Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest* **111**:163-169.
- Ishibashi S, Kuroiwa T, Endo S, Okeda R and Mizusawa H (2003) Neurological dysfunctions versus regional infarction volume after focal ischemia in Mongolian gerbils. *Stroke* **34**:1501-1506.
- Ivanov VN and Hei TK (2005) Combined treatment with EGFR inhibitors and arsenite upregulated apoptosis in human EGFR-positive melanomas: a role of suppression of the PI3K-AKT pathway. *Oncogene* **24**:616-626.
- Jenner P (1994) Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet* **344**:796-798.
- Kahn K (1972) The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbil. *Neurology* **22**:510-515.
- Kaltschmidt B, Sparna T and Kaltschmidt C (1999) Activation of NF-kappa B by reactive oxygen intermediates in the nervous system. *Antioxid Redox Signal* **1**:129-144.
- Kaushal V and Schlichter LC (2008) Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra. *J Neurosci* **28**:2221-2230.
- Keyse SM and Tyrrell RM (1987) Rapidly occurring DNA excision repair events determine the biological expression of u.v.-induced damage in human cells. *Carcinogenesis* **8**:1251-1256.
- Kim YS, Zhuang H, Koehler RC and Dore S (2005) Distinct protective mechanisms of HO-1 and HO-2 against hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* **38**:85-92.
- Kirino T (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* **239**:57-69.
- Klein JA and Ackerman SL (2003) Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest* **111**:785-793.
- Koh JY and Choi DW (1987) Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods* **20**:83-90.
- Kohen R and Nyska A (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* **30**:620-650.
- Kohler C, Orrenius S and Zhivotovsky B (2002) Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods* **265**:97-110.

- Kohno K, Miyake M, Sano O, Tanaka-Kataoka M, Yamamoto S, Koya-Miyata S, Arai N, Fujii M, Watanabe H, Ushio S, Iwaki K and Fukuda S (2008) Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of 2-amino-3H-phenoxazin-3-one. *Biol Pharm Bull* **31**:1938-1945.
- Kumar A, Takada Y, Boriek AM and Aggarwal BB (2004) Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med* **82**:434-448.
- Kwak HB, Sun HM, Ha H, Lee JH, Kim HN and Lee ZH (2008) AG490, a Jak2-Specific Inhibitor, Induces Osteoclast Survival By Activating the Akt and ERK Signaling Pathway. *Mol Cells* **26**.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lai PF, Mohamed F, Monge JC and Stewart DJ (2003) Downregulation of eNOS mRNA expression by TNFalpha: identification and functional characterization of RNA-protein interactions in the 3'UTR. *Cardiovasc Res* **59**:160-168.
- Lee SB, Bae IH, Bae YS and Um HD (2006) Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death. *J Biol Chem* **281**:36228-36235.
- Lees KR, Zivin JA, Ashwood T, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Grotta J, Lyden P, Shuaib A, Hardemark HG and Wasiewski WW (2006) NXY-059 for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* **354**:588-600.
- Lin R, Kwok JC, Crespo D and Fawcett JW (2008) Chondroitinase ABC has a long-lasting effect on chondroitin sulphate glycosaminoglycan content in the injured rat brain. *J Neurochem* **104**:400-408.
- Liu B and Hong JS (2003) Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther* **304**:1-7.
- Lo EH (2008) A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* **14**:497-500.
- Lorrio S, Sobrado M, Arias E, Roda JM, Garcia AG and Lopez MG (2007) Galantamine postischemia provides neuroprotection and memory recovery against transient global cerebral ischemia in gerbils. *J Pharmacol Exp Ther* **322**:591-599.
- Loskota WJ, Lomax P and Rich ST (1974) The gerbil as a model for the study of the epilepsies. Seizure patterns and ontogenesis. *Epilepsia* **15**:109-119.

- Lu YC, Yeh WC and Ohashi PS (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**:145-151.
- Maines MD (2004) The heme oxygenase system: past, present, and future. *Antioxid Redox Signal* **6**:797-801.
- Malarkey K, Belham CM, Paul A, Graham A, McLees A, Scott PH and Plevin R (1995) The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem J* **309** ( Pt 2):361-375.
- Mantena SK and Katiyar SK (2006) Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-kappaB signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Radic Biol Med* **40**:1603-1614.
- Marinissen MJ, Tanos T, Bolos M, de Sagarra MR, Coso OA and Cuadrado A (2006) Inhibition of heme oxygenase-1 interferes with the transforming activity of the Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* **281**:11332-11346.
- Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, De Galarreta CM and Cuadrado A (2004) Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem* **279**:8919-8929.
- Mitsopoulos P, Omri A, Alipour M, Vermeulen N, Smith MG and Suntres ZE (2008) Effectiveness of liposomal-N-acetylcysteine against LPS-induced lung injuries in rodents. *Int J Pharm* **363**:106-111.
- Miyata S, Nishimura Y, Hayashi N and Oohira A (2005) Construction of perineuronal net-like structure by cortical neurons in culture. *Neuroscience* **136**:95-104.
- Molina-Holgado F, Pinteaux E, Heenan L, Moore JD, Rothwell NJ and Gibson RM (2005) Neuroprotective effects of the synthetic cannabinoid HU-210 in primary cortical neurons are mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *Mol Cell Neurosci* **28**:189-194.
- Monfort J, Martel-Pelletier J and Pelletier JP (2008) Chondroitin sulphate for symptomatic osteoarthritis: critical appraisal of meta-analyses. *Curr Med Res Opin* **24**:1303-1308.
- Morawski M, Bruckner MK, Riederer P, Bruckner G and Arendt T (2004) Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Exp Neurol* **188**:309-315.



- Moro MA, De Alba J, Cardenas A, De Cristobal J, Leza JC, Lizasoain I, Diaz-Guerra MJ, Bosca L and Lorenzo P (2000) Mechanisms of the neuroprotective effect of aspirin after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Neuropharmacology* **39**:1309-1318.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**:55-63.
- Nakka VP, Gusain A, Mehta SL and Raghubir R (2008) Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities. *Mol Neurobiol* **37**:7-38.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F and Riccardi C (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* **139**:271-279.
- Nimura T, Weinstein PR, Massa SM, Panter S and Sharp FR (1996) Heme oxygenase-1 (HO-1) protein induction in rat brain following focal ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* **37**:201-208.
- O'Neill LA and Kaltschmidt C (1997) NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* **20**:252-258.
- Obara M, Szeliga M and Albrecht J (2008) Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses. *Neurochem Int* **52**:905-919.
- Okamoto M, Mori S and Endo H (1994a) A protective action of chondroitin sulfate proteoglycans against neuronal cell death induced by glutamate. *Brain Res* **637**:57-67.
- Okamoto M, Mori S, Ichimura M and Endo H (1994b) Chondroitin sulfate proteoglycans protect cultured rat's cortical and hippocampal neurons from delayed cell death induced by excitatory amino acids. *Neurosci Lett* **172**:51-54.
- Parfenova H, Basuroy S, Bhattacharya S, Tcheranova D, Qu Y, Regan RF and Leffler CW (2006) Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**:C1399-1410.
- Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ and Bae YS (2004) Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for

- lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol* **173**:3589-3593.
- Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J and Kanmogne GD (2006) Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* **1**:223-236.
- Piotrowska A, Izykowska I, Podhorska-Okolow M, Zabel M and Dziegiel P (2008) [The structure of NF- kappaB family proteins and their role in apoptosis]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **62**:64-74.
- Piva R, Belardo G and Santoro MG (2006) NF-kappaB: a stress-regulated switch for cell survival. *Antioxid Redox Signal* **8**:478-486.
- Poss KD and Tonegawa S (1997a) Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:10919-10924.
- Poss KD and Tonegawa S (1997b) Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:10925-10930.
- Quinlan KL, Naik SM, Cannon G, Armstrong CA, Bunnett NW, Ansel JC and Caughman SW (1999) Substance P activates coincident NF-AT- and NF-kappa B-dependent adhesion molecule gene expression in microvascular endothelial cells through intracellular calcium mobilization. *J Immunol* **163**:5656-5665.
- Ramirez-Exposito MJ and Martinez-Martos JM (1998) [Structure and functions of the macroglia in the central nervous system. Response to degenerative disorders]. *Rev Neurol* **26**:600-611.
- Reginster JY, Heraud F, Zegels B and Bruyere O (2007) Symptom and structure modifying properties of chondroitin sulfate in osteoarthritis. *Mini Rev Med Chem* **7**:1051-1061.
- Ricchetti GA, Williams LM and Foxwell BM (2004) Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* **76**:719-726.
- Ruoslahti E (1996) Brain extracellular matrix. *Glycobiology* **6**:489-492.
- Ryan KA, Smith MF, Jr., Sanders MK and Ernst PB (2004) Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect Immun* **72**:2123-2130.
- Salinas M, Diaz R, Abraham NG, Ruiz de Galarreta CM and Cuadrado A (2003) Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by

- increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *J Biol Chem* **278**:13898-13904.
- Schipper HM (2004) Heme oxygenase-1: transducer of pathological brain iron sequestration under oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* **1012**:84-93.
- Schipper HM, Cisse S and Stopa EG (1995) Expression of heme oxygenase-1 in the senescent and Alzheimer-diseased brain. *Ann Neurol* **37**:758-768.
- Segura T, Calleja S and Jordan J (2008) Recommendations and treatment strategies for the management of acute ischemic stroke. *Expert Opin Pharmacother* **9**:1071-1085.
- Seki Y, Feustel PJ, Keller RW, Jr., Tranmer BI and Kimelberg HK (1999) Inhibition of ischemia-induced glutamate release in rat striatum by dihydrokinate and an anion channel blocker. *Stroke* **30**:433-440.
- Sethi G, Sung B and Aggarwal BB (2008) Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med (Maywood)* **233**:21-31.
- Sherman LS and Back SA (2008) A 'GAG' reflex prevents repair of the damaged CNS. *Trends Neurosci* **31**:44-52.
- Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Ashwood T, Wasiewski WW and Emeribe U (2007) NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* **357**:562-571.
- Tacchini L, De Ponti C, Matteucci E, Follis R and Desiderio MA (2004) Hepatocyte growth factor-activated NF-kappaB regulates HIF-1 activity and ODC expression, implicated in survival, differently in different carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* **25**:2089-2100.
- Takuma K, Baba A and Matsuda T (2004) Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol* **72**:111-127.
- Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B and Rincon M (2008) Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* **320**:667-670.
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**:335-344.
- Volpi N and Tarugi P (1999) Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position, and molecular mass on Cu<sup>2+</sup>-mediated oxidation of human low-

- density lipoproteins: effect of normal human plasma-derived chondroitin sulfate. *J Biochem* **125**:297-304.
- Williams KJ (2001) Arterial wall chondroitin sulfate proteoglycans: diverse molecules with distinct roles in lipoprotein retention and atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* **12**:477-487.
- Wong CH and Crack PJ (2008) Modulation of neuro-inflammation and vascular response by oxidative stress following cerebral ischemia-reperfusion injury. *Curr Med Chem* **15**:1-14.
- Wu KK (2007) Differential cyclooxygenase-2 transcriptional control in proliferating versus quiescent fibroblasts. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **83**:175-181.
- Xu CX, Jin H, Chung YS, Shin JY, Woo MA, Lee KH, Palmos GN, Choi BD and Cho MH (2008) Chondroitin sulfate extracted from the *Styela clava* tunic suppresses TNF-alpha-induced expression of inflammatory factors, VCAM-1 and iNOS by blocking Akt/NF-kappaB signal in JB6 cells. *Cancer Lett* **264**:93-100.
- Zielasek J and Hartung HP (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. *Adv Neuroimmunol* **6**:191-122.

